

© ПЛОСКОНОС М.В., 2016

УДК 612.616.083

Плосконос М.В.^{1,2}

СРАВНИТЕЛЬНАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА МЕТОДОВ ВЫДЕЛЕНИЯ СПЕРМАТОЗОИДОВ ИЗ НАТИВНОГО ЭЯКУЛЯТА МУЖЧИН

¹ГБОУ ВПО Астраханский государственный медицинский университет Минздрава России, 414000, Астрахань, Россия;
²Каспийский институт морского и речного транспорта-филиал ФГБОУ ВО Волжский государственный университет водного транспорта, 414000, Астрахань, Россия

Описаны методы выделения сперматозоидов из нативного эякулята: метод отмывания от семенной плазмы, метод всплытия «swim-up» и метод центрифугирования эякулята в градиенте плотности. Дается сравнительная характеристика эффективности методов, а также описаны их недостатки. Выбор метода зависит от того, проводится выделение половых клеток для исследовательских целей или для клинического использования, а также от характеристик эякулята и правил, предусмотренных в конкретной лаборатории.

Ключевые слова: эякулят; сперматозоиды; «swim-up»; градиентное центрифугирование.

Для цитирования: Плосконос М.В. Сравнительная характеристика методов выделения сперматозоидов из нативного эякулята мужчин. Клиническая лабораторная диагностика. 2016; 61 (6): 342-347. DOI: 10.18821/0869-2084-2016-61-6-342-347.

Ploskonos M.V.^{1,2}

THE COMPARATIVE CHARACTERISTIC OF TECHNIQUES OF ISOLATION OF SPERMATOOZONS FROM NATIVE MALE EJACULATE

¹The Astrakhanskii state medical university of Minzdrav of Russia, 414000 Astrakhan, Russia; ²The Kaspiiskii institute of marine and river transport-the branch of the Voljkskii state university of water transport, 414000 Astrakhan, Russia

The article presents description of isolation of spermatozoa from native ejaculate: technique of washing off seminal plasma, technique of swim-up and technique of centrifugation of ejaculate in density gradient. The comparative characteristic of effectiveness of techniques is given. The shortcomings of techniques are described too. The choice of technique depends on necessity of carrying out isolation of germ cells for investigation purposes or clinical application and also on characteristics of ejaculate and rules specified in particular laboratory.

Key words: ejaculate; spermatozoa; swim-up; gradient centrifugation

For citation: Ploskonos M.V. The comparative characteristic of techniques of isolation of spermatozoons from native male ejaculate. Klinicheskaya Laboratornaya Diagnostika (Russian Clinical Laboratory Diagnostics) 2016; 61 (6): 342-347. (in Russ.)

DOI: 10.18821/0869-2084-2016-61-6-342-347

For correspondence: Ploskonos M.V., candidate of biological sciences; associate professor of chair of chemistry. e-mail: ea_tkachuk@mail.ru

Conflict of interests. The authors declare absence of conflict of interests.

Financing. The study had no sponsor support

Received 01.09.2015
Accepted 15.01.2016

Эякулятом принято называть порцию сперматозоидов и спермоплазмы, выделяющихся из уретры за одну эякуляцию. При проведении научных и лабораторных исследований, а также при селекции клеток с целью дальнейшего их использования в программах вспомогательных репродуктивных технологий (ВРТ) бывает необходимо отделение половых клеток от спермоплазмы.

Существует несколько методов выделения сперматозоидов из нативного эякулята: метод отмывания от семенной плазмы, метод всплытия «swim-up» и метод центрифугирования эякулята в градиенте плотности [1]. Другие методы обработки спермы, например методы фильтрации (в колонках из стекловолокна, стеклянных гранул или поперечно-сшитого декстранового геля), используются крайне редко в силу их неоправданной трудоемкости.

Важным условием при выборе того или иного метода яв-

ляется сохранение жизнеспособности и кинетических параметров мужских половых клеток после их выделения, а при выделении сперматозоидов с целью их селекции для программ ВРТ необходимо получение фракции прогрессивно подвижных форм сперматозоидов с нормальной структурой хроматина. Ключевым моментом при выделении сперматозоидов является то, что сперма должна быть подготовлена в течение одного часа после получения [2].

Достаточно часто применяется метод отмывания, в результате которого нативный эякулят разделяют на сперматозоиды и семенную плазму центрифугированием при 1700 g, дважды отмывая сперматозоиды физиологическим раствором [3–6]. Paasch U. и соавт. после разведения эякулята в 0,9% растворе NaCl (1:1) выполняли отмывание центрифугированием при 400 g в течение 5 мин [7].

Lachaud C. и соавт. в своем исследовании проводили отмывание сперматозоидов в фосфатно-солевом буфере (PBS; pH = 7,4) (1:10) с дальнейшим центрифугированием при 220 g в течение 10 мин, после чего семенная плазма была удалена, а полученный осадок был ресуспендирован в 1 мл среды Menezo B2 (BioMerieux, France) [8].

Для корреспонденции: Плосконос Мария Вячеславовна, канд. биол. наук, доц. каф. химии Астраханского государственного медицинского университета, 414000, Астрахань, ploskonoz@mail.ru

Отмывание — самый простой метод, который чаще всего применяется к эякуляту высокого качества при подготовке сперматозоидов к программам ВРТ. При этом проводится однократная или двойная отмывка сперматозоидов культуральной средой с последующим центрифугированием. К недостаткам метода принято относить образование активных форм кислорода в осадке клеток после центрифугирования, а также оседание вместе с подвижными сперматозоидами потенциально токсичных клеток и мертвых сперматозоидов, что может оказывать негативный эффект и сказываться на сохранности генетического материала жизнеспособных сперматозоидов.

Одним из наиболее важных факторов для определения вероятности успеха в ВРТ и нормального развития эмбриона является качество половых клеток. Плохо подготовленные сперматозоиды не позволят получить эмбрионы хорошего качества. Успешное оплодотворение и дальнейшее полноценное развитие эмбриона возможны только при условии нормальной структуры хроматина сперматозоидов.

Стандартные процедуры определения функционально-морфологических параметров сперматозоидов — например, подвижность сперматозоидов, — поддаются экспресс-анализу под световым микроскопом, но хорошие параметры не всегда соответствуют высокой оплодотворяющей способности спермы или возможности обеспечивать дальнейшее развитие в зиготу [9, 10, 11]. Полноценность спермального хроматина не может быть оценена методом быстрой световой микроскопии. Поэтому важно использовать такую технологию обработки спермы, которая гарантированно позволит отобрать функционально активные сперматозоиды с нормальной структурой хроматина из общей популяции, имеющейся в наличии.

Так, одним из направлений оптимизации программы экстракорпорального оплодотворения (ЭКО) является разработка методов, позволяющих с наибольшей эффективностью выделить из эякулята фракцию прогрессивно подвижных сперматозоидов, используемую для инсеминации ооцитов, которая имела бы наилучшие показатели кинематики и морфологии [12]. Поэтому наиболее широко применяемыми в программах ВРТ и в большинстве андрологических лабораторий для получения подвижной фракции являются метод всплытия «swim-up» [13, 14, 15] либо фракционирование эякулята в градиенте плотности (технология обработки спермы «Percoll» или «PureSperm») [16—19].

Метод центрифугирования эякулята в градиенте плотности. Центрифугирование спермы в градиенте плотности позволяет отобрать подвижные сперматозоиды с нормальной морфологией. Метод основан на принципе центрифугирования спермы через градиент, образованный двумя-тремя слоями растворов с возрастающей плотностью (масса/объем), содержащими различные концентрации частиц коллоидного кремния. Таким образом, подход основан на разделении компонентов (клеток) эякулята по их удельному весу и плотности.

При методе градиентного центрифугирования образец эякулята располагается поверх градиента. При центрифугировании различные клетки занимают определенное положение, в котором их плавучая плотность соответствует плотности градиента. Разделение основано на том, что зрелые сперматозоиды имеют плотную упаковку ДНК и большую плотность, чем 80% раствор, поэтому проходят сквозь него и оседают на дне пробирки. Сперматозоиды, получаемые со дна пробирки, обладают наибольшей подвижностью. Градиентное центрифугирование применяется многими лабораториями IVF как штатный способ обработки спермы низкого качества.

Технология центрифугирования сперматозоидов в градиенте плотности была впервые разработана в 1996 г. с использованием в качестве коллоида «Percoll™» («KABI Pharmacia»,

Швеция) [20]. Его применение было ограничено производителем только для исследовательских целей.

В лабораторных условиях растворы перколла готовят на HBS + BSA буфере с pH 8,0 (0,13 M NaCl, 0,004 M KCl, 0,001 M CaCl₂, 0,0005 M MgCl₂, 0,014 M фруктозы, 0,01 M N-2-гидроксиэтилпиперазин-N'-2-этансульфоново́й кислоты и 1 мг/мл бычьего сывороточного альбумина).

C. Lachaud и соавт. в своем исследовании выделяли сперматозоиды из эякулята центрифугированием в градиенте плотности перколла (40—80%) при 200 g в течение 20 мин, после чего Percoll был заменен Hams F-10 (Sigma, St Louis, MO) с добавлением 1%-ного бычьего сывороточного альбумина и 25 мМ HEPES (pH = 8,0) (Sigma). 40% фракция было удалено, а более плотный слой был повторно ресуспендирован в 10 мл PBS и снова центрифугирован при 600 g в течение 10 мин. Полученный осадок был ресуспендирован в 1 мл среды Menezo B2 (BioMerieux, Франция) [8].

Для клинического использования в качестве материала для выделения сперматозоидов из спермы методом центрифугирования в градиенте плотности применяется «PureSperm» («Nidacon International AB», Швеция) [21].

«PureSperm» состоит из коллоидного раствора двуокиси кремния в сбалансированном растворе солей, забуференном HEPES. Производитель рекомендует двухслойный градиент, включающий 40% и 80% PureSperm, который можно создавать за счет разбавления PureSperm буфером PureSperm Buffer или применять готовые к использованию PureSperm 40 и PureSperm 80 («Nidacon International AB», Швеция). Для достижения наилучших результатов градиент следует готовить непосредственно перед использованием и подогреть до комнатной температуры.

Методика выделения сперматозоидов из эякулята методом центрифугирования в градиенте плотности с использованием «PureSperm» заключается в следующем:

1. Сперму инкубируют при 37°C в течение 30 мин для разжижения.
 2. Подготавливают два градиента: например, 1,5 мл 40% компонента и 1,5 мл 80% компонента в пробирке с конической дном.
 3. Разжиженный эякулят осторожно, не нарушая разделение слоев (что может понизить эффективность сепарации), наслаивают на градиент.
 4. Центрифугируют при 300 g в течение 20 мин. После центрифугирования на дне конической центрифужной пробирки образуется осадок из наиболее подвижной фракции сперматозоидов.
 5. Пастеровской пипеткой осторожно удаляют семенную плазму, а также верхнюю интерфазу, 40% слой и нижнюю интерфазу. Оставляют основную часть 80% слоя.
 6. Чистой стерильной пастеровской пипеткой, погруженной в 80% слой, аспирируют осадок, ресуспендируют его в буфере для гамет и переносят в чистую центрифужную пробирку для отмывания остатков коллоидного раствора.
 7. Центрифугируют 10 мин при 600 g.
 8. Повторяют отмывку с буфером для гамет.
 9. Удаляют супернатант и ресуспендируют в небольшом объеме среды для приготовления сперматозоидов или среды для оплодотворения.
 10. Подсчитывают количество сперматозоидов и вычисляют концентрацию. При необходимости делают разведение. Хранят в инкубаторе с 6% CO₂ при 37°C.
- При правильном выполнении вышеописанной методики осадок содержит только функционально активные подвижные сперматозоиды, которые могут быть использованы для процедуры ВРТ (внутриутробной инсеминации (ИСМ/ИМД), ЭКО или интрацитоплазматической инъекции сперматозоида (ИКСИ)).

Сравнительный анализ технологий обработки спермы «Percoll» и «PureSperm» показывает, что последняя технология обладает некоторыми преимуществами перед «Percoll»; это делает возможным ее клиническое использование. В-первых, Percolltm состоит из частиц двуокиси кремния, связанных с поливинилпирролидоном (ПВП) в воде, и к нему перед использованием необходимо добавлять специальный солевой раствор. PureSperm содержит силансвязанные частицы двуокиси кремния в HEPES-забуференном сбалансированном растворе солей, который поддерживает жизнеспособность сперматозоидов во время центрифугирования [21].

Во-вторых, содержание ПВП в Percolltm служит причиной субмикроскопических изменений. Известно, что его использование для замедления движения сперматозоидов перед процедурой ИКСИ вызывает несвоевременную деконденсацию спермального хроматина и снижение процента оплодотворения [22, 23, 24].

В-третьих, присутствие HEPES в качестве буфера в PureSperm оказывает антиоксидантное действие. PureSperm в процессе производства стерилизуется автоклавированием и имеет очень низкий уровень эндотоксинов. Percolltm не может быть автоклавирован и имеет значительные колебания в содержании эндотоксинов от партии к партии, что приводит к невозможности использования некоторых партий для обработки сперматозоидов [21].

Метод «swim-up». Метод всплытия «swim-up», или флотация, довольно часто используется при миграции сперматозоидов. Подход имитирует естественное перемещение сперматозоидов через цервикальную слизь. При этом фракция спермы располагается под фракцией культуральной среды, что позволяет прогрессивно подвижным сперматозоидам переместиться во фракцию среды. К недостатку метода «swim-up» следует отнести неадекватность подхода при выраженной астенозооспермии (низкой подвижности сперматозоидов).

Выделение сперматозоидов данным методом можно осуществлять либо из нативной спермы, в результате чего подвижные сперматозоиды из центрифугированного осадка выходят в верхнюю фазу — в наслоенную чистую среду, либо лучше сначала отмыть сперматозоиды и ресуспендировать осадок перед последующим выделением спермиев всплытием. Для вязкого образца спермы можно сделать предварительное разведение со средой для сперматозоидов.

Методика выделения сперматозоидов из нативной спермы методом всплытия «swim-up» с использованием среды ReadySwimtm («Nidacon International AB», Швеция) заключается в следующем:

1. В центрифужной пробирке на аликвоту разжиженного эякулята наслаивают среду для метода «swim-up» ReadySwimtm.

2. Пробирку ставят в термостат под углом примерно в 45°. Инкубируют в течение 1 ч при 37°C.

3. После инкубации аккуратно отбирают около 1 мл суспензии над спермой, чтобы не повредить нижний слой и интерфазу, и центрифугируют при 600 g в течение 10 мин до образования осадка из сперматозоидов.

4. Отбирают осадок и затем ресуспендируют его в малом объеме подходящей среды для приготовления сперматозоидов или среды для оплодотворения, чтобы использовать при внутриматочной инсеминации, ЭКО или ИКСИ.

5. Подсчитывают количество сперматозоидов и определяют их концентрацию. Хранят в инкубаторе с 6% CO₂ при 37°C.

Методика выделения предварительно отмытых сперматозоидов методом всплытия заключается в следующем:

1. В коническую пробирку отбирают аликвоту разжиженного эякулята и добавляют примерно такой же объем буфера для гамет. Центрифугируют при 300 g в течение 20 мин.

2. Удаляют супернатант, а осадок ресуспендируют в буфере для гамет. Центрифугируют при 300 g в течение 10 мин.

3. Удаляют супернатант, а на осадок наслаивают среду для сперматозоидов и инкубируют в атмосфере CO₂ в течение 1 ч при 37°C.

4. Отбирают супернатант со «всплывшими» сперматозоидами и переносят в чистую пробирку, подсчитывают концентрацию спермиев.

С. Lachaud и соавт. в своем исследовании для выделения сперматозоидов из спермы методом «swim-up» аликвоту разжиженного эякулята центрифугировали сначала с PBS при 220 g в течение 10 мин, а после удаления семенной плазмы, полученный осадок ресуспендировали в 1 мл среды Menezo B2 («BioMerieux», France) и инкубировали (вертикально) в течение 1 ч при температуре 37°C в атмосфере 5% CO₂. В конце инкубации отбирали подвижную фракцию сперматозоидов [8].

Сравнение методов «swim-up» и центрифугирования эякулята в градиенте плотности. По сути, метод «swim-up» позволяет выделять сперматозоиды от остального состава эякулята исключительно благодаря их подвижности. Хотя этот метод и увеличивает процент выделения подвижных сперматозоидов при обработке эякулята, однако малоподвижные сперматозоиды тоже могут попадать в среду вместе с активно подвижными, как и сперматозоиды с морфологическими дефектами и поврежденной ДНК, т.е. метод «swim-up» не отделяет ни морфологически деформированные сперматозоиды, ни сперматозоиды с нарушенным хроматином [21]. К сожалению, в процессе «swim-up» не удаляются бактерии и вирусы, тогда как присутствие продуцируемых бактериями эндотоксинов или реакционно активных соединений кислорода из клеток, мертвых или погибающих сперматозоидов оказывает губительное действие на функциональную полноценность хроматина, на оплодотворяющую способность и выживаемость всех сперматозоидов [9, 25, 26, 27].

Напротив, центрифугирование в градиенте плотности фракционирует клеточные популяции в соответствии с их плотностью и подвижностью. В процессе центрифугирования сперматозоиды перемещаются к той позиции в градиенте, которая отвечает их собственной плотности, т.е. к своей изопикнической точке [21]. Так, сперматозоиды с нарушенным хроматином обладают меньшей плотностью и будут задерживаться в верхнем слое или на границе раздела сред градиента. Точно так же, изопикническая точка для сперматозоидов с морфологическими дефектами головки из-за их отличающейся плотности будет находиться на другом уровне, на котором они и будут концентрироваться [28]. Таким образом, сперматозоиды с неповрежденной ДНК находятся в прямой зависимости от доли сперматозоидов с интактной ДНК [29].

Кроме того, в процессе градиентного центрифугирования могут быть отделены другие клетки, присутствующие в эякуляте, — например, лейкоциты и эпителиальные клетки, так же, как мертвые и погибающие сперматозоиды, которые служат источником реакционно активных форм кислорода и могут вызывать оксидативный стресс [26, 27, 30]. Одновременное удаление сперматозоидов с поврежденным хроматином и источников реакционногенных видов кислорода должно смягчить воздействие их высокой концентрации на образцы спермы в процессе ее обработки [21].

Некоторые авторы считают, что применение перколлы позволяет в более полной мере выделять из нативного эякулята прогрессивно подвижные сперматозоиды [31, 32]. В то же время, С. Lachaud и другие авторы считают, что популяция сперматозоидов, полученная при использовании метода «swim-up», характеризуется лучшими кинематическими параметрами, а также меньшим числом нежизнеспособных и

апоптотических сперматозоидов по сравнению с популяцией клеток, выделенных методами простого отмывания от семенной плазмы и непрерывного центрифугирования в градиенте плотности перколла [3, 8, 33—36].

Относительно того, какой из методов выделения фракции подвижных клеток в большей степени повышает долю морфологически нормальных сперматозоидов, нет единого мнения. Имеются указания на преимущества использования как перколла [37, 38], так и «swim-up» [31], а также на равную эффективность этих методов [33].

В отличие от «swim-up», в процессе градиентного центрифугирования удаляются аномальные сперматозоиды, посторонние клетки и бактерии. Сперматозоиды с дефектами морфологии способны осуществлять оплодотворение, однако дальнейшее развитие таких эмбрионов и развитие беременности могут быть нарушены: имеются сведения о взаимосвязи морфологии сперматозоидов и процента оплодотворения. Р. Prakash и соавт. считают, что использование метода градиентного центрифугирования для приготовления образцов спермы помогает улучшить результативность программ ВРТ за счет повышения оплодотворяемости ооцитов [28].

Сперматозоиды с дефектами хроматина конкурируют с нормальными спермиями в процессе оплодотворения, поэтому во избежание получения эмбрионов низкого качества очень важно не допустить их попадания в суспензию, предназначенную для ЭКО. По данным Воробьевой О.А. и соавт., сравнительный анализ этих двух основных методов выделения прогрессивно подвижной фракции сперматозоидов показал, что метод «swim-up» более эффективен при селекции клеток с нормальным хроматином, чем градиент плотности [39]. Более того, после обработки в градиенте «PureSperm» в некоторых случаях ДНК-индекс фрагментации (ИФ) повышался [40]. Средний ИФ в эякуляте составлял 12%, а после применения «swim-up» — 5,5% [40, 41].

О.А. Воробьева и О.А. Леонтьева [12, 39] считают, что наиболее эффективным для выделения из нативного эякулята фракции прогрессивно подвижных форм сперматозоидов и при селекции клеток с нормальной структурой хроматина является комбинированный метод, суть которого заключается в последовательном применении центрифугирования в изотоническом 90% перколле и дальнейшего всплытия сперматозоидов из полученного осадка. Эта модификация позволяет сочетать преимущества обеих методик [31]. В частности, было показано, что при этом эффективно повышается доля сперматозоидов с нормальной структурой хроматина [42]. Применение комбинированного метода выделения прогрессивно подвижной фракции позволяет получить популяцию сперматозоидов со значительно лучшими морфологическими характеристиками по сравнению с нативным эякулятом как при нормо-, так и при патоспермии [12].

Немаловажным при выделении сперматозоидов из нативного эякулята для селекции клеток с целью дальнейшего их использования в программах ВРТ является контроль контаминации.

Кроме основных компонентов — семенной жидкости (спермоплазмы) и сперматозоидов, эякулят содержит также иммунные и эпителиальные клетки, клеточный дебрис и имеет собственную микрофлору, содержит бактерии. Может иметь место и вирусное обсеменение. Каждый из этих компонентов оказывает значительное влияние на выживаемость и оплодотворяющую способность сперматозоидов [25, 43—46]. Поэтому использование методов «swim-up» и фракционирования в градиенте плотности иногда необходимо при обработке контаминированных вирусами эякулятов.

Бактерии в приготовленных образцах спермы могут контаминировать среду, используемую в программах ЭКО для культивирования эмбрионов. Наличие бактерий в эякуляте

при их адгезии на поверхности сперматозоидов [47] может оказывать прямое влияние на фертильные свойства последних через угнетение их подвижности, преждевременное индуцирование акросомной реакции и изменение морфологии [25, 48].

Боле того, бактериальная микрофлора может проявлять не прямое воздействие, продуцируя эндотоксины. Факторы патогенности и отдельные структурные компоненты бактериальной клетки могут повреждать нуклеарный хроматин в сперматозоидах, влиять на оплодотворяющую способность и вызывать апоптоз сперматозоидов [25, 49]. Даже несмотря на высокий процент оплодотворения ооцитов в культурах, инфицированных некоторыми микроорганизмами, эмбрионы не способны развиваться в них до стадии бластоцисты.

Поэтому очень важным с точки зрения защиты гамет от повреждения и предупреждения аллергических реакций у пациентов и медицинского персонала является контроль бактериальной контаминации в обработанных образцах спермы без использования антибиотиков, так как некоторые из них могут быть токсичны для спермы.

Сочетание пенициллина и стрептомицина может быть использовано в средах для сперматозоидов, но пенициллин G разрушается в культуральной среде на 50% в течение 24 ч при 37°C [50]. Таким образом, предпочтительнее использовать такую технологию приготовления спермы для удаления бактериальной микрофлоры, которая позволяет избежать добавления антибиотиков в среду для отмывки сперматозоидов.

Способность градиента PureSperm удалять вирусы — например, вирус иммунодефицита человека (ВИЧ) или вирус гепатита С — имеет важное значение для предложения ВРТ супружеским парам, в которых муж инфицирован [21, 51, 52].

Применение градиента PureSperm в сочетании с методом «swim-up» при выделении сперматозоидов для ВРТ способно снижать вирусную контаминацию ниже уровня детекции [53, 54, 55] и является безопасной альтернативой для зачатия ребенка у супружеских пар, в которых муж серопозитивен по ВИЧ [51].

В то же время отделение всех вирусов от популяции сперматозоидов может быть невозможным. Так, например, с помощью полимеразной цепной реакции удалось идентифицировать ДНК вируса папилломы человека в сперматозоидах после обработки в градиенте перколла, т.е. сперматозоиды могут служить в качестве векторов для определенных вирусов [56]. Однако некоторые авторы считают, что вирус папилломы человека может удаляться градиентом плотности PureSperm [57].

Заключение. Анализируя данные разных исследований, проведенных как в России, так и за рубежом, можно заключить, что до настоящего времени не сложилось единого мнения, какой метод лучше использовать для выделения сперматозоидов из нативного эякулята. Выбор метода зависит от того, проводится выделение половых клеток для исследовательских целей или для клинического использования, а также от характеристик эякулята и правил, предусмотренных в конкретной лаборатории.

Финансирование. Исследование не имело спонсорской поддержки.

Конфликт интересов. Автор заявляет об отсутствии конфликта интересов.

ЛИТЕРАТУРА (п.п. 7—9, 13—24, 27—33, 37—38, 40—41, 47—48, 50—57 см. REFERENCES)

1. Плосконос М.В. Методы выделения сперматозоидов из эякулятов мужчин. *Журнал Национальной ассоциации ученых «Отечественная наука в эпоху изменений: постулаты прошлого и теории нового времени»*. 2015; (4 часть 6): 117—8.

2. Плосконос М.В. Применение эозина и йодистого пропидия для оценки жизнеспособности сперматозоидов человека. *Клиническая лабораторная диагностика*. 2014; 59 (11): 22—5.
3. Быкова М.В., Титова Н.М., Маркова Е.В., Светлаков А.В. Про/антиоксидантный статус в сперматозоидах и семенной плазме мужчин при патоспермии. *Проблемы репродукции*. 2008; (3): 63—7.
4. Долгов В.В., Луговская С.А., Фанченко Н.Д., Миронова И.И., Назарова Е.К., Ракова Н.Г. и др. *Лабораторная диагностика мужского бесплодия*. М.: Кафедра КЛД; 2006.
5. Плосконос М.В., Николаев А.А. «Абортивный» апоптоз сперматозоидов: какова его доля в эякуляте фертильного мужчины. *Проблемы репродукции*. 2014; 20 (6): 70—5.
6. Плосконос М.В. «Абортивный» апоптоз сперматозоидов фертильных мужчин. *Международный журнал экспериментального образования*. 2014; (3—2): 147.
10. Плосконос М.В., Николаев А.А. Растворимая форма мембранного Fas-антигена (sFas-антигена) в норме и при патологии. *Астраханский медицинский журнал*. 2010; 5 (4): 20—7.
11. Плосконос М.В., Николаев А.А. Мембранная и растворимая форма FasL и активность матрилизина в репродуктивной системе мужчин. *Астраханский медицинский журнал*. 2011; 6 (3): 43—8.
12. Леонтьева О.А., Воробьева О.А. Сравнительный анализ морфологии сперматозоидов человека: нативный эякулят — прогрессивно подвижная фракция. *Проблемы репродукции*. 1999; (3): 29—36.
25. Плосконос М.В., Николаев А.А. Влияние липополисахаридов Chlamydia trachomatis на апоптоз сперматозоидов и развитие мужского бесплодия. *Урология*. 2014; (1): 84—7.
26. Плосконос М.В. Экстернализация фосфатидилсерина на поверхность мембран сперматозоидов под действием оксидативного стресса. *Российский иммунологический журнал*. 2015; 9 (1 (1)): 156—7.
34. Плосконос М.В. Методы определения апоптоза сперматозоидов (Обзор литературы). *Клиническая лабораторная диагностика*. 2013; (4): 3—8.
35. Плосконос М.В., Николаев А.А. Апоптоз и мужская фертильность. *Врач*. 2014; (3): 23—5.
36. Плосконос М.В. Влияние миллиметрового электромагнитного излучения низкой интенсивности на процесс апоптоза мужских половых клеток. *Успехи современного естествознания*. 2015; (1—6): 974—6.
39. Воробьева О.А., Воскресенская А.В., Одинцов А.А., Филатов М.В. Мужское бесплодие и нарушение структурной организации хроматина сперматозоидов. Существует ли связь? *Проблемы репродукции*. 2005; 11 (6): 56—62.
42. Воробьева О.А., Семенова Е.В., Филатов М.В. Оценка методом проточной цитофотометрии эффективности очистки сперматозоидов в программе ЭКО. Актуальные вопросы физиологии и патологии репродуктивной функции женщины. В кн.: *Материалы XXIV научной сессии НИИ акушерства и гинекологии имени Д.О. Отта РАМН*. СПб.; 1995: 53—4.
43. Плосконос М.В., Николаев А.А. Содержание свободных полиаминов в спермоплазме фертильных и субфертильных мужчин. *Проблемы репродукции*. 2010; 16 (3): 80—2.
44. Плосконос М.В. Значение полиаминов в репродуктивной функции мужчин. *Успехи современного естествознания*. 2004; (11): 97—8.
45. Плосконос М.В., Николаев А.А., Николаев А.А. *Определение полиаминов в различных биологических объектах*. Астрахань: Издательство Астраханской государственной медицинской академии; 2007.
46. Плосконос М.В., Николаев А.А. Экспрессия белков, контролирующих апоптоз, у больных раком предстательной железы. *Проблемы репродукции*. 2013; (6): 14—7.
49. Божедомов В.А., Теодорович О.В. Эпидемиология и причины аутоиммунного мужского бесплодия. *Урология*. 2005; (1): 35—44.

Поступила 01.09.15

REFERENCES

1. Ploskonos M.V. Methods recovered spermatozoa men from ejaculate. *Zhurnal Natsional'noy assotsiatsii uchenykh «Otechestvennaya nauka v epokhu izmeneniy: postulaty proshlogo i teorii novogo vremeni»*. 2015; (4 pt. 6): 117—8. (in Russian)
2. Ploskonos M.V. The application of eosin and propidium iodide in evaluation of vitality of human spermatozoa. *Klinicheskaya laboratornaya diagnostika*. 2014; 59 (11): 22—5. (in Russian)
3. Bykova M.V., Titova N.M., Markova E.V., Svetlakov A.V. Pro/antioxidant status in spermatozoa and seminal plasma in the male pathospermia. *Problemy reproduksii*. 2008; (3): 63—7. (in Russian)
4. Dolgov V.V., Lugovskaya S.A., Fanchenko N.D., Mironova I.I., Nazarova E.K., Rakova N.G. et al. *Laboratory Diagnosis of Male Infertility [Laboratornaya diagnostika muzhskogo besplodiya]*. Moscow: Kafedra KLD; 2006. (in Russian)
5. Ploskonos M.V., Nikolaev A.A. What is «abortive» sperm apoptosis share in the ejaculate of fertile men? *Problemy reproduksii*. 2014; 20 (6): 70—5. (in Russian)
6. Ploskonos M.V. «Abortive» apoptosis sperm of fertile men. *Mezhdunarodnyy zhurnal eksperimental'nogo obrazovaniya*. 2014; (3—2): 147. (in Russian)
7. Paasch U., Grunewald S., Dathe S., Glander H.J. Mitochondria of human spermatozoa are preferentially susceptible to apoptosis. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 2004; 1030: 403—9.
8. Lachaud C., Tesarik J., Canadas M.L., Mendoza C. Apoptosis and necrosis in human ejaculated spermatozoa. *Hum. Reprod.* 2004; 19 (3): 607—10.
9. Evenson D.P., Larson K.L., Jost L.K. Sperm chromatin structure assay: its clinical use for detecting sperm DNA fragmentation in male infertility and comparison with other technique. *J. Androl.* 2002; 23 (1): 25—43.
10. Ploskonos M.V., Nikolaev A.A. A soluble form of membrane Fas-antigen (sFas-antigen) in normal and pathological conditions. *Astrakhanskiy meditsinskiy zhurnal*. 2010; 5 (4): 20—7. (in Russian)
11. Ploskonos M.V., Nikolaev A.A. The membrane and soluble form of FasL and matrilysin activity in the reproductive system of men. *Astrakhanskiy meditsinskiy zhurnal*. 2011; 6 (3): 43—8. (in Russian)
12. Leont'eva O.A., Vorob'eva O.A. Comparative analysis of human sperm morphology: the native ejaculate — progressively moving fraction. *Problemy reproduksii*. 1999; (3): 29—36. (in Russian)
13. Zini A., Finelli A., Phang D., Jarvi K. Influence of semen processing technique on human sperm DNA integrity. *Urology*. 2000; 56 (6): 1081—4.
14. Younglai E.V., Holt D., Brown P., Jurisicova A., Casper R.F. Sperm swim-up techniques and DNA fragmentation. *Hum. Reprod.* 2001; 16 (9): 1950—3.
15. Almeida C., Cardoso M., Sousa M. Quantitative study of caspase-3 activity in semen and after swim-up preparation in relation to sperm quality. *Hum. Reprod.* 2005; 20 (5): 1307—13.
16. WHO laboratory manual for the examination of human sperm and semen-cervical mucus interaction. WHO, 4 ed. Cambridge: University Press; 1999.
17. Mortimer D. Sperm Preparation Methods. *J. Androl.* 2000; 21 (3): 357—66.
18. Sakkas D., Manicardi G.C., Tomlinson M. The use of two density gradient centrifugation techniques and the swim-up method to separate spermatozoa with chromatin and nuclear DNA anomalies. *Hum. Reprod.* 2000; 15 (5): 1112—6.
19. Gadella B.M., Harrison R.A. Capacitation induces cyclic adenosine 3',5'-monophosphate-dependent, but apoptosis-unrelated, exposure of aminophospholipids at the apical head plasma membrane of boar sperm cells. *Biol. Reprod.* 2002; 67 (1): 340—50.
20. Boulton V.N., Braude P.R. Preparation of human spermatozoa for in vitro fertilisation by isopycnic centrifugation of self-generating density gradients. *Arch. Androl.* 1984; 13 (2—3): 167—76.
21. Morrell J.M., Sakkas D., Moffatt O., Manicardi G.C., Bizzaro D., Holmes P.V. Reduced senescence and retained chromatin integrity in

- human sperm prepared by density gradient centrifugation. *J. Androl.* 2001; Suppl (Abstr P5/6): 34.
22. Strehler E., Baccetti B., Sterzik K., Capitani S., Collodel G., De Santo M. et al. Detrimental effects of polyvinylpyrrolidone on the ultrastructure of spermatozoa (Notulae seminologicae 13). *Hum. Reprod.* 1998; 13 (1): 120—3.
 23. Hlinka D., Herman M., Vesela J., Hredzak R., Horvath S., Pacin J. A modified method of intracytoplasmic sperm injection without the use of polyvinylpyrrolidone. *Hum. Reprod.* 1998; 13 (7): 1922—7.
 24. Tsai M.Y., Huang F.J., Kung F.T., Lin Y.C., Chang S.Y., Wu J.F. et al. Influence of Polyvinylpyrrolidone on the outcome of intracytoplasmic sperm injection. *J. Reprod. Med.* 2000; 45 (2): 115—20.
 25. Ploskonos M.V., Nikolaev A.A. Effect of chlamydia trachomatis lipopolysaccharides on sperm apoptosis and development of male infertility. *Urologiya.* 2014; (1): 84—7. (in Russian)
 26. Ploskonos M.V. Externalization of phosphatidylserine on the membrane surface spermatozoa under the influence of oxidative stress. *Rossiyskiy immunologicheskii zhurnal.* 2015; 9 (1 (1)): 156—7. (in Russian)
 27. Aitken R.J., Baker M.A., Sawyer D. Oxidative stress in the male germ line and its role in the etiology of male infertility and genetic disease. *Reprod. Biomed. Online.* 2003; 7 (1): 65—70.
 28. Prakash P., Leykin L., Chen Z., Toth T., Sergegh R., Schiff I. et al. Preparation by differential gradient centrifugation is better than swim-up in selecting sperm with normal morphology (strict criteria). *Fertil. Steril.* 1998; 69 (4): 722—6.
 29. Tomlinson M.J., Moffatt O., Manicardi G.C., Bizzaro D., Afnan M., Sakkas D. Interrelationships between seminal parameters and sperm nuclear DNA damage before and after density gradient centrifugation: implications for assisted conception. *Hum. Reprod.* 2001; 16 (10): 2160—5.
 30. Morrell J.M., Winblad C., Georgakas A., Stuhmann G., Humblot P., Johannisson A. Reactive oxygen species in stallion semen can be affected by season and colloid centrifugation. *Anim. Reprod. Sci.* 2013; 140 (1—2): 62—9.
 31. Ng F.L., Liu D.Y., Baker H.W. Comparison of Percoll and swim-up methods for sperm preparation from abnormal semen samples. *Hum. Reprod.* 1992; 7 (2): 261—6.
 32. Shalika S., Dugan K., Pelesh D., Padilla S. A Mono-Percoll separation technique improves sperm recovery of normal and male factor specimens when compared with the swim-up technique. *Hum. Reprod.* 1995; 10 (12): 3195—7.
 33. Chen S.U., Ho H.N., Chen H.F. Comparison between a two-layer discontinuous Percoll gradient and swim-up for sperm preparation on normal and abnormal semen samples. *Assist. Reprod. Genet.* 1995; 12 (10): 698—703.
 34. Ploskonos M.V. The techniques to detect apoptosis of spermatozooids (Literature review). *Klinicheskaya laboratornaya diagnostika.* 2013; (4): 3—8. (in Russian)
 35. Ploskonos M.V., Nikolaev A.A. Apoptosis and male fertility. *Vrach.* 2014; (3): 23—5. (in Russian)
 36. Ploskonos M.V. Influence of millimeter electromagnetic radiation of low intensity on apoptosis of male germ cells. *Uspekhi sovremennogo estestvoznaniya.* 2015; (1—6): 974—6. (in Russian)
 37. Van Der Zvalmen P., Bertin Segal G., Geerts L., Debauche C., Schoysman R. Sperm morphology and IVF pregnancy rate: comparison between Percoll gradient centrifugation and swim-up procedures. *Hum. Reprod.* 1991; 6 (4): 581—8.
 38. Singer R., Fish B., Levinsky H., Zukerman Z., Sagiv M., Cohen A. et al. Separation of human semen on Percoll gradients: effect on percentage of motile and morphologically normal sperm and proportion of acrosome reacted sperm. *Int. J. Fertil. Menopausal Stud.* 1995; 40 (3): 161—6.
 39. Vorob'eva O.A., Voskresenskaya A.V., Odintsov A.A., Filatov M.V. Male infertility and violation of the structural organization of chromatin sperm. Is there a connection? *Problemy reproduktiv.* 2005; 11 (6): 56—62. (in Russian)
 40. Gandini L., Lombardo F., Paoli D., Caruso F., Eleuteri P., Leter G. et al. Full-term pregnancies achieved with ICSI despite high levels of sperm chromatin damage. *Hum. Reprod.* 2004; 19 (6): 1409—17.
 41. Spano M., Cordeli E., Leter G., Lombardo F., Lenzi A., Gandini L. Nuclear chromatin variations in human spermatozoa undergoing swim-up and cryopreservation evaluated by the flow cytometric sperm chromatin structure assay. *Mol. Hum. Reprod.* 1999; 5 (1): 29—37.
 42. Vorob'eva O.A., Semenova E.V., Filatov M.V. Evaluation by flow cytophotometry cleaning efficiency of sperm in IVF program. Topical issues of the physiology and pathology of the reproductive function of women. In: *Proceedings of the Scientific Session of XXIV Research Institute of Obstetrics and Gynecology D.O. Otta RAMN [Materialy XXIV nauchnoy sessii NII akusherstva i ginekologii imeni D.O. Otta RAMN].* St. Petersburg; 1995: 53—4. (in Russian)
 43. Ploskonos M.V., Nikolaev A.A. The maintenance of the free polyamines in the spermoplasm of the fertile and subfertile men. *Problemy reproduktiv.* 2010; 16 (3): 80—2. (in Russian)
 44. Ploskonos M.V. The value of polyamines in the reproductive function of men. *Uspekhi sovremennogo estestvoznaniya.* 2004; (11): 97—8. (in Russian)
 45. Ploskonos M.V., Nikolaev A.A., Nikolaev A.A. *Determination of Polyamines in Various Biological Objects [Opredelenie poliaminov v razlichnykh biologicheskikh ob'ektakh].* Astrakhan': Izdatel'stvo Astrakhanskoy gosudarstvennoy meditsinskoy akademii; 2007. (in Russian)
 46. Ploskonos M.V., Nikolaev A.A. The expression of proteins, controlling apoptosis, in prostate cancer patients. *Problemy reproduktiv.* 2013; (6): 14—7. (in Russian)
 47. Diemer T., Weidner W., Michelmann H.W., Schiefer H.G., Rován E., Mayer F. Influence of Escherichia coli on motility parameters of human spermatozoa in vitro. *Int. J. Androl.* 1996; 19 (5): 271—7.
 48. el-Mulla K.F., Köhn F.M., Dandal M., el Beheiry A.H., Schiefer H.G., Weidner W. et al. In vitro effect of Escherichia coli on human sperm acrosome reaction. *Arch. Androl.* 1996; 37 (2): 73—8.
 49. Bozhedomov V.A., Teodorovich O.V. Epidemiology and causes autoimmune male infertility. *Urologiya.* 2005; (1): 35—44. (in Russian)
 50. Neftel K.A., Muller M.R., Walti M., Erni J., Gugler M., Arrenbrecht S. Penicillin-G degradation products inhibit in vitro granulopoiesis. *Br. J. Haematol.* 1983; 54 (2): 255—60.
 51. Lyerly A.D., Anderson J. Human immunodeficiency virus and assisted reproduction: reconsidering evidence, reframing ethics. *Fertil. Steril.* 2001; 75 (5): 843—58.
 52. Cassuto N.G., Sifer C., Naouri M., Bouret D., Blanc-Layrac G., Benifla J.L. et al. Screening of hepatitis C virus (HCV) in the different fractions of semen from infected infertile men. *Hum. Reprod.* 2001; 16: 139.
 53. Marina S., Marina F., Alcolea R., Nadal J., Exposito R., Huguet J. Pregnancy following intracytoplasmic sperm injection from an HIV-1-seropositive man. *Hum. Reprod.* 1998; 13 (11): 3247—9.
 54. Marina F., Alcolea R., Exposito R., Martin P., Fosas N., Perez N. et al. Special semen-washing technique as a safe method for using assisted-reproduction techniques in HIV-1 seropositive men. *Hum. Reprod.* 1998; 15: 155—6.
 55. Pasquier C., Daudin M., Righi L., Berges L., Thauvin L., Berrebi A. et al. Sperm washing and virus nucleic acid detection to reduce HIV and hepatitis C virus transmission in serodiscordant couples wishing to have children. *AIDS.* 2000; 14 (14): 2093—9.
 56. Chan P.J., Su B.C., Kalugdan T., Seraj I.M., Tredway D.R., King A. Human papilloma virus gene sequences in washed human sperm deoxyribonucleic acid. *Fertil. Steril.* 1994; 61 (5): 982—5.
 57. Aynaud O., Poveda J.D. Frequency of herpes simplex virus, cytomegalovirus and human papillomavirus DNA in semen. *J. Androl.* 2001; Suppl (Abstr) 1: 2—141.