

УДК 616.69-008.8-076.1

А. О. КОЛОМИЕЦ¹, Л. В. БАТУРЕВИЧ²

СРАВНИТЕЛЬНЫЙ АНАЛИЗ МЕТОДОВ ОКРАШИВАНИЯ ЭЯКУЛЯТА

¹ Научно- исследовательский институт экспериментальной и клинической медицины УО «Белорусский государственный медицинский университет», Минск, Республика Беларусь;

² Институт повышения квалификации и переподготовки кадров здравоохранения УО «Белорусский государственный медицинский университет», Минск, Республика Беларусь

В статье приведены литературные данные по оценке морфологических характеристик сперматозоидов. Изучены и описаны имеющие историческое значение и современные методы окрашивания препаратов эякулята. Отражены достоинства и недостатки разных методов окрашивания эякулята при оценке морфологии мужских половых клеток. Приведены результаты аналитического обзора литературных данных.

Ключевые слова: мужское бесплодие, морфологическая оценка сперматозоидов, эякулят, окрашивание эякулята.

Введение. В настоящее время частота встречаемости бесплодных браков составляет 10–15 %, причем около 25 % не достигают беременности в течение 1 года лечения по поводу бесплодия, и около 5 % семейных пар так и остаются бесплодными. Данная социальная проблема затрагивает практически в равной степени как женское, так и мужское население. Примерно 40 % случаев приходится на мужское бесплодие, 40 % – на женское, ещё 20 % – на смешанное [1].

С каждым годом отмечается рост заболеваний органов репродуктивной системы у мужчин. Это связано с изменением образа жизни современного мужчины, влиянием вредных привычек и факторов окружающей среды, бесконтрольным применением лекарственных средств. Влияние этих и других факторов на организм мужчины нередко приводит к развитию такой серьезной проблемы, как бесплодие. Комплексное и поэтапное клинико-лабораторное исследование пациентов с мужской инфертильностью позволяет дифференцированно и своевременно назначать лечение и оценить его эффективность в динамике.

Для установки причин нарушения фертильности проводится ряд лабораторных исследований, центральное место среди которых занимает спермограмма. Классическая спермограмма включает ряд показателей, позволяющих предположить причину нарушения фертильности и составить план дальнейшего обследования и лечения. При анализе результатов исследования ориентируются на нормы, рекомендованные Всемирной Организацией Здравоохранения [2].

Такие показатели спермограммы как количество сперматозоидов, их подвижность являются основными и используются при первичном скрининговом обследовании пациентов с бесплодием [5]. Морфологическая характеристика сперматозоидов является одним из основных показателей классической спермограммы, позволяющая определить наличие дефектов строения, влияющих на функцию половых клеток. Морфологические особенности спермиев влияют на возможность зачатия и являются хорошим индикатором мужской фертильности. При поиске причин бесплодия важно выявление наличия тех или иных отклонений в строении сперматозоидов, их сочетание друг с другом и с прочими характеристиками эякулята. Любое изменение в морфологии преобладающего числа спермиев приводит к снижению шансов на оплодотворение и риску выкидышей при успешном зачатии. При наличии нарушений в строении головки подвижные сперматозоиды не способны проникнуть в женскую половую клетку и оплодотворить ее, при патологии хвоста сперматозоиды становятся неподвижными или движутся хаотично, что также влияет на оплодотворяющую способность эякулята [3].

Снижение количества сперматозоидов с нормальными морфологическими характеристиками часто требует использование вспомогательных репродуктивных технологий, таких как интрацитоплазматическая инъекция сперматозоида (ИКСИ), экстракорпоральное оплодотворение (ЭКО). Но и успех в проведении данных технологий также в значительной степени зависит от морфологических характеристик спермиев [4].

Материалы и методы исследования. Проведен анализ литературных данных за последние 70 лет по методам окраски эякулята, используемых при оценке морфологии сперматозоидов. В зависимости от различных способов окраски, рекомендованных в разные года Всемирной Организацией Здравоохранения, существуют разные подходы к классификации дефектов мужских половых клеток, которые также рассматриваются в представленной статье. Поиск литературных данных осуществлялся с помощью медицинской базы данных MEDLINE, документального фонда библиотеки учреждения образования «Белорусский государственный медицинский университет», также с использованием электронных ресурсов.

Результаты и их обсуждение. Наиболее часто при обследовании мужчин при подозрении на бесплодие выявляется состояние субфертильности. Важнейшей характеристикой эякулята, нуждающейся при оценке состояния субфертильности, является морфология сперматозоидов [6].

В начале 1930-х были сделаны первые попытки оценить морфологические особенности сперматозоидов при бесплодии. Препарат эякулята, приготовленный обычным способом, фиксировался путем проведения предметного стекла с биоматериалом над пламенем горелки. Затем препарат несколько секунд обрабатывался 1 % раствором хлорамина для удаления слизи, водой и 95° этиловым спиртом. Окрашивание проводилось смесью фуксина и эозина или карболовым фуксином Циля в течение 2–5 минут. Растворы красителей готовили *ex tempore* [7].

Существует 2 метода приготовления карболового фуксина Циля:

1-й метод: использовался фуксин основной 1 г, спирт этиловый 96 % 10 мл, кристаллическая карболовая кислота 5 г, дистиллированная вода 100 мл;

2-й метод: использовался 10 % насыщенный спиртовой раствор основного фуксина 10 мл и 100 мл 5 % раствора карболовой кислоты.

После окрашивания препараты эякулята промывали водой и при необходимости докрашивали раствором Леффлера. Присутствие более 20 % (а по некоторым данным более 40 %) морфологически атипичных форм сперматозоидов считали основной причиной инфертильности у мужчин [8].

В 50-е годы при оценке морфологии сперматозоидов придерживались, подхода, предложенного MacLeod J., Gold R.Z. (либеральный подход) [9]. При этом приготовленные и высушенные при комнатной температуре препараты эякулята фиксировали 10 % раствором формалина и окрашивали либо раствором гематоксилина, либо методом Кауфмана. Рядом авторов было рекомендовано для оценки морфологии сперматозоидов использовать витальную окраску генциановым фиолетовым.

При окрашивании в течение 2–3 минут фиксированного мазка эякулята методом Кауфмана использовали Леффлеровскую метиленовую синьку. В состав Леффлеровской метиленовой синьки входит:

- 3 г метиленового синего, 20 мл 96 % раствора этилового спирта;
- 1 мл 1 % раствора гидроксида калия;
- 100 мл дистиллированной воды.

После окрашивания препарат смывался водой и погружался в 0,5 % раствор азотнокислого серебра или в 0,25 % водный раствор протаргола на 3–4 минуты. Затем окрашивали препарат в течение 5–10 секунд раствором карболового фуксина, разведенного в 20 раза. Многоэтапность окрашивания является недостатком метода Кауфмана. Достоинствами метода Кауфмана является: быстрота (вся процедура занимает менее трех минут), чистый фон мазка (слизистые элементы семенной жидкости не окрашиваются), четкая очерченность головки, шейки и хвоста сперматозоидов.

Согласно либеральному подходу, сперматозоиды разделялись по форме головки на группы:

- с нормальной овальной формой;
- с сужающейся или грушевидной головкой;
- с круглыми, гигантскими или булавочной формой головками;
- с дублирующими головками;
- с головками аморфного типа.

В своих исследованиях MacLeod J., Gold R.Z. использовали данный метод окрашивания препаратов эякулята и показали взаимосвязь между аномальной морфологией сперматозоидов и мужским бесплодием. К группе мужчин с сохраненной фертильностью были отнесены пациенты, в эякуляте которых присутствовало не более 20 % сперматозоидов с морфологическими дефектами. Но критерии, позволяющие отнести мужскую половую клетку к группе сперматозоидов с нормальной или патологической морфологией, не были четко определены. Все сперматозоиды без четко

визуализируемых в препаратах дефектов относили к группе клеток с нормальной морфологией, что, конечно, зависело от качества окрашивания препаратов.

В 1971 году R. Eliasson предложил разделять сперматозоиды с патологической морфологией на три группы: с аномалией головки, средней части и хвоста [5]. В это же время было предложено окрашивать препараты эякулята по Паппенгейму или гематоксилин-эозином.

При окраске препаратов по Паппенгейму используют краситель-фиксатор Май-Грюнвальда и краситель Романовского-Гимзе. Приготовленные и высушенные препараты эякулята помещают в неразведенный краситель-фиксатор Май-Грюнвальда, являющийся смесью эозина, метиленовой сини и метилового спирта. Спустя 3–5 минут фиксации раствор Май-Грюнвальда смывают небольшим количеством воды и заливают рабочим раствором красителя Романовского-Гимзе на 15–30 минут. После окраски препараты смывают водой и высушивают при комнатной температуре.

Окраска по Паппенгейму позволяет оценить размер и форму половых клеток, но не обеспечивает подробную и детальную визуализацию акросомальной и постакросомальной областей, осевого прикрепления средней части сперматозоида к головке. При этом сперматозоиды характеризуются большим разнообразием качества окрашивания. В этот период предложенный R. Eliasson принцип – «если вы не уверены, что сперматозоид ненормальный, он должен рассматриваться как нормальный» изменился. Все сперматозоиды с «пограничными» морфологическими характеристиками стали относить к группе половых клеток с патологической морфологией.

В 1980 и 1987 годах были опубликованы первое и второе издания рекомендаций Всемирной Организацией Здравоохранения по исследованию семенной жидкости [8]. Морфологические характеристики сперматозоидов были рекомендованы оценивать, основываясь на исследованиях R. Menkveld и R. Eliasson. При этом было рекомендовано окрашивать препараты по Папаниколау.

Метод окрашивания по Папаниколау многоэтапный, сперматозоиды окрашиваются в разные цвета: средние части сперматозоидов окрашиваются в красный цвет, а цитоплазматические капли в области акросомы – в зеленый. Сперматозоиды с простыми свернутыми хвостиками не относились к группе патологических клеток, так как считалась что такая аномалия может быть связана с осмотическим стрессом, который испытывает половая клетка при окрашивании [10].

В первом издании руководства Всемирной Организации Здравоохранения по лабораторному исследованию эякулята человека были приведены референсные значения по ряду показателей спермограммы. В каждом последующем издании руководства эти референсные значения лабораторных показателей спермограммы менялись в сторону снижения нижней границы.

Так в первом издании рекомендаций Всемирной Организации Здравоохранения по исследованию эякулята нижняя граница количества сперматозоидов с нормальной морфологией была 80,5%, во втором издании – 50 %, в третьем – 30 %, в четвёртом – 14 %, а в пятом издании нижняя граница референсных значений морфологически нормальных форм сперматозоида составила 4 %. При этом морфологические изменения в строении сперматозоидов подразделялись также на патологию головки, средней части и хвоста [11].

В более поздних изданиях руководства Всемирной Организации Здравоохранения по исследованию эякулята для оценка морфологических характеристик сперматозоидов были предложены «строгие критерии» Kruger-Menkveld [10]:

- головка ровная с четкой акросомой, составляющей 40–70 % головки;
- длина головки 3–5 мкм, ширина 2–3 мкм;
- отсутствие дефектов шеи или хвоста;
- средняя часть прикреплена в осевом направлении относительно головки;
- ширина средней части менее 1 мкм, длина примерно в полтора раза больше длины головы;
- могут присутствовать цитоплазматические капли (остатки), которые составляют менее половины размера головки спермы;
- хвост равномерный, немного тоньше, чем средняя часть, не свернутый, длиной 45 мкм;
- отношение длины головки к длине хвоста – 1:9 или 1:10. Пограничные формы головы без грубых отклонений рассматриваются как патологические [12].

При этом оценка морфологии сперматозоидов рекомендовано проводить в препаратах, окрашенных по Папаниколау, Шорру или красителем Diff-Quik. Метод по Шорру обеспечивает схожие результаты окрашивания препаратов эякулята с методом по Папаниколау (Meschede et al., 1993). Фиксация суховоздушных мазков спермы осуществляется погружением предметного стекла в

уксусный этанол или 75 % (v/v) этанол на 1 ч. Окраска фиксированных мазков спермы заключается в последовательном погружении предметного стекла в следующие растворы:

- гематоксилин (1–2 мин.);
- аммиачный спирт (10 погружений);
- этанол 50 % (5 мин.);
- краситель Шорра (3–5 мин.);
- этанол 50 % (5 мин.);
- этанол 75 % (5 мин.);
- этанол 95 % (5 мин.).

Одно погружение предметного стекла в емкость с раствором должно длиться около 1 секунды. После каждого реактива препарат эякулята ополаскивается проточной водой (12–15 погружений).

Перед использованием красителя Шорра 4 г порошка Шорра растворяют в 220 мл подогретого 50 % этанола. Далее охлаждают и добавляют 2 мл ледяной уксусной кислоты и фильтруют. При этом головка сперматозоида в акросомальной области окрашивается в бледно-синий, а в постакросомальной в темно-синий цвет. Средняя часть сперматозоида окрашивается в красный цвет, хвост в синий или имеет красноватый оттенок [13]. Метод окрашивания по Шорру длительный и кропотливый.

Метод быстрого окрашивания с использованием набора Diff-Quik рекомендуется как один из скрининговых методов, который особенно полезен в клинических лабораториях, когда необходимо получить результат в день сдачи анализа. Набор для быстрого окрашивания Diff-Quik, состоит из:

- фиксатора – триарилметан, растворенный в метиловом спирте;
- красителя – эозинофильный ксантен;
- красителя – базофильный тиазин.

Фиксация суховоздушных мазков спермы осуществляется погружением предметного стекла в фиксатор триарилметан на 15 сек или в 95 % метанол на 1 ч. После подсушивания препарат фиксированных мазков спермы окрашивается путем последовательного погружения в растворы эозинофильного ксантина и базофильного тиазина. Излишний раствор удаляется на каждом этапе окрашивания путем помещения предметных стекол вертикально на фильтровальную бумагу [14, 15]. Данный метод окрашивания не лишён недостатков, одним из которых является не четкое окрашивание акросомальной области головки.

В 2021 году было выпущено шестое издание руководства Всемирной Организации Здравоохранения по обработке и исследованию эякулята человека, в котором был предложен ряд концепций по выполнению и интерпретации результатов исследования эякулята. Однако, существенных изменений в исследовании морфологических характеристик сперматозоидов не было предложено. Рекомендации по окрашиванию препаратов эякулята для оценки морфологических характеристик мужских половых клеток не изменились. Основные рекомендуемые методы окрашивания: метод по Шорру и метод быстрого окрашивания с помощью набора Diff-Quik.

Однако, в шестом издании руководства Всемирной Организации Здравоохранения отмечено, что некоторые мазки, окрашенные быстрыми методами, имеют высокую фоновую окраску и могут быть более низкого качества, чем мазки, окрашенные красителем Папаниколау. Было отмечено, что в препаратах эякулята, окрашенных методами по Шорру и с помощью набора Diff-Quik в сравнении с препаратами, окрашенными методом по Папаниколау, размеры головок сперматозоидов различаются [16].

Также при окрашивании препаратов эякулята для оценки морфологических характеристик мужских половых клеток существуют ряд других цитохимических методов окрашивания, хорошо себя зарекомендовавших, но отсутствующих в рекомендациях в шестом издании руководства Всемирной Организации Здравоохранения. Такими методами являются окрашивание набором реагентов «ГЕМСТАНДАРТ-СПЕРМОГРАММА» (производитель ООО «ГЕМСТАНДАРТ», Санкт-Петербург, Россия) и набором Spermac Stain (производитель FertiPro N.V., Бельгия).

Набор «ГЕМСТАНДАРТ-СПЕРМОГРАММА» включает ряд реагентов для спермиологического исследования, среди которых присутствует краситель азури-эозин по Романовскому и фиксатор-краситель эозин метиленовый синий по Май-Грюнвальду, используемых для оценки морфологических характеристик сперматозоидов. По сути, фиксирование препаратов эякулята раствором-красителем по Май-Грюнвальду с последующей окраской азури-эозином по Романовскому это хорошо известный старый метод окрашивания по Паппенгейму, о котором мы упоминали выше. При использовании красителей набора реагентов «ГЕМСТАНДАРТ-

СПЕРМОГРАММА», как и при окрашивании по Паппенгейму, ядра клеток окрашиваются в сине-фиолетовый цвет, головки сперматозоидов окрашиваются в синий цвет с сиреневой или фиолетовой акросомальной частью. Хвосты сперматозоидов окрашиваются в нежно-сиреневый цвет [17].

В некоторых лабораториях морфология сперматозоидов оценивалась в препаратах, окрашенных красителями набора Spermac Stain. Набор Spermac Stain позволяет хорошо оценить морфологию мужских половых клеток, поскольку части сперматозоида (голова, акросома, экваториальный сегмент, средняя часть и хвост) окрашивают в разные цвета, облегчая дифференцирование сперматозоидов с аномальным строением. Методика включает следующие этапы:

1) фиксирование готовых препаратов эякулята путем погружения в фиксатор на 5 мин. Более длительное фиксирование допустимо. После препарат просушивается при комнатной температуре в вертикальном положении, не допуская касания к мазку эякулята в течение 15 мин;

2) поэтапное окрашивание в красителях:

- использование красителя А – 2 минуты;
- использование красителя Б – 1 минута;
- использование красителя С – 1 минута.

При окрашивании препарат несколько раз погружается в емкости с красителями и при смене красителя промывается и просушивается. Однако, данный метод окрашивания с использованием набора Spermac Stain имеет свои недостатки. Данный метод окрашивания длительный, кропотливый. При присутствии большого количества слизи в образце эякулята приводит к тому, что происходит нечеткое окрашивание сперматозоидов, не всегда прокрашиваются ядра в красный цвет, что затрудняет дифференцирование сперматозоидов с нормальной и патологической морфологией [18].

Заключение. 1. Современные рекомендации по исследованию эякулята человека – это результат долгих и кропотливых исследований в области лабораторной диагностики мужского бесплодия и репродуктологии. Эти рекомендации являются не окончательными и будут подвергаться дальнейшим изменениям.

2. Продолжается поиск более информативных, доступных и практичных методов окрашивания препаратов эякулята для оценки морфологических характеристик сперматозоидов и повышения диагностической эффективности исследования эякулята при нарушении фертильности мужчин.

3. Современные методы окрашивания препаратов эякулята, как рекомендованные Всемирной Организацией Здравоохранения, так и не вошедшие в рекомендации, имеют ряд недостатков. При окрашивании в препаратах: отсутствует четкая границы ядро/акросома, не всегда хорошо просматриваются ядро и жгутик, некоторые методы окраски длительные и не могут быть использованы в рутинной лабораторной практике. А так как от качества окраски зависит качество морфологической оценки, то это подталкивает к продолжению и поиску новых красителей и более удачных методов окрашивания препаратов эякулята.

Литература:

- [1] Долгов В.В., Луговская С.А., Фанченко Н.Д. Лабораторная диагностика мужского бесплодия. Тверь: ООО «Издательство «Триада», 2006. 145 с.
- [2] Предтеченский В.Е., Боровская В.М., Марголина Л.Т. Руководство по лабораторным методам исследования. НАРКОМЗДРАВ СССР: МЕДГИЗ, Москва-Ленинград, 1938. 605 с.
- [3] Ernest W., Page M., Florence Houlding A.B. The clinical interpretation of 1000 semen analyses among applicants for sterility studies // Fertility and Sterility. 1951. Vol. 2. P. 140–151.
- [4] Marriage J., Ruth Z. The male factor in fertility and infertility. Sperm morphology in fertile and infertile // Fertility and Sterility. 1951. Vol. 5. P. 394–414.
- [5] Eliasson R., Treichl L. Supravital staining of human spermatozoa // Fertility and Sterility. 1971. Vol. 22. P.134–137.
- [6] Web of science. – <http://www.myshared.ru/slide/492107/>.
- [7] Mortimer D., Leslie E.E., Kelly R.W., Templeton A.A. Morphological selection of human spermatozoa in vivo and in vitro. // Journals of Reproduction and Fertility. 1982. Vol. 64. P. 391–399.
- [8] Гатимель Н., Моро Ж., Парино Ж., Леандри Р.Д. Морфология спермы: оценка, патофизиология, клиническая значимость и современное состояние в 2017 году // Андрология. 2017. №5. С. 845–862.
- [9] Kruger T., Thomas C., Daniel R., Franken Ph.D., Menkveld R., Carl J. Sperm morphology: assessing the agreement between the manual method (strict criteria) and the sperm morphology analyzer IVOS t // Fertility and Sterility. 1995. Vol. 63. P. 134–141.

- [10]Ombelet W., Bosmans E., Janssen M. et al. Semen parameters in a fertile versus subfertile population: a need for change in the interpretation of semen testing // Human Reproduction. 1997. Vol.12. P. 987–993.
- [11]Gatimel N., Moreau J., Parinaud J., Léandri R.D. Sperm morphology: assessment, pathophysiology, clinical relevance, and state of the art in 2017 // Andrology. 2017. P.845–862.
- [12]Руководство ВОЗ по лабораторному исследованию эякулята человека и взаимодействия сперматозоидов с цервикальной слизью: переведено с англ. // МедПресс. 2001. 144 с.
- [13]Олефир Ю.В., Монаков Д.М. Клиническое значение морфологии сперматозоидов в выборе метода лечения мужского бесплодия // Андрология. 2021. №14. С. 127–132.
- [14]Руководство ВОЗ по лабораторному исследованию эякулята человека и взаимодействия сперматозоидов с цервикальной слизью: переведено с англ. М.: Капитал принт // Всемирная Организация Здравоохранения. № 5. 2010. 54 с.
- [15]WHO Manual for the Examination and Processing of human semen // World Health Organization. 6th ed 2021. P. 4960.
- [16]Сапожкова Ж.Ю., Еремин К.И., Долгов В.В. Унификация процедур цитохимического окрашивания эякулята для определения фертильности мужчины// Журнал: Лабораторная диагностика. Восточная Европа. 2020. №1–2. С. 41–49.
- [17]Web of science. – <https://celldiagnostic.by/>.
- [18]MacLeod J., Gold R.Z. The Male Factor in Fertility and Infertility // Sperm morphology. 1951. Vol. 2. P. 394–414.

A. O. KOLOMIETS¹, L. V. BATUREVICH²

COMPARATIVE ANALYSIS OF EJACULATE STAINING METHODS

*¹ Research Institute of Experimental and Clinical Medicine, Belarusian State Medical University,
Minsk, Republic of Belarus*

*² Institute for Advanced Training and Retraining of Healthcare Personnel, Belarusian State Medical
University, Minsk, Republic of Belarus*

Summary

Current literature information on the morphological assessment of spermatozoa is provided, which makes it possible to determine the presence of structural defects that affect the function of germ cells. Both leading and outdated variants of sperm staining have been studied and described. The advantages and disadvantages of the morphological assessment of male germ cells using different staining methods are reflected. The main results of an analytical review of literature data are presented.

Key words: male infertility, morphological assessment of sperm, ejaculate, ejaculate staining.