

Количественное электронно-микроскопическое исследование сперматозоидов при диагностике мужского бесплодия

Е.Е. Брагина¹, Е.Н. Бочарова²

¹НИИ физико-химической биологии им. А.Н. Белозерского ФГБОУ ВПО МГУ им. М.В. Ломоносова;

²ГБУЗ «Московский научно-практический центр дерматовенерологии и косметологии»
Департамента здравоохранения г. Москвы, филиал «Клиника им. В.Г. Короленко»

Контакты: Елизавета Ефимовна Брагина bragor@mail.ru

Традиционное изучение показателей спермограммы является основным методом обследования мужчин при нарушениях фертильности. Однако показатели спермограммы могут значительно перекрываться в группе фертильных и инфертильных мужчин и не дают полного представления о фертилизационной способности сперматозоидов. В последние годы интенсивно разрабатываются тесты, позволяющие определять функциональные свойства сперматозоидов. В настоящем обзоре рассматривается метод количественного электронно-микроскопического исследования сперматозоидов (ЭМИС), который позволяет оценить структуру и функции пенетрационного и двигательного аппарата сперматозоидов. Выявление нарушений в структуре хроматина сперматозоидов позволяет понять причины нарушения раннего эмбрионального развития. Приводятся показания для применения и интерпретация результатов ЭМИС.

Ключевые слова: ультраструктура сперматозоидов, хроматин сперматозоидов, акросома, астенозооспермия

Quantitative electron microscopic examination of sperm for male infertility diagnosis

Ye. Ye. Bragina¹, Ye. N. Bocharova²

¹A.N. Belozersky Institute of Physico-Chemical Biology, M.V. Lomonosov Moscow State University;

²Moscow Scientific and Practical Center of Dermatology and Venereology and Cosmetology,
Moscow Healthcare Department, Branch "V.G. Korolenko Clinic"

The traditional study of spermogram readings is a main method for examination of male infertility. However, the spermogram readings may be considerably covered in the group of fertile and infertile men and fail to give a full insight into sperm fertilizing ability. In recent years, tests determining the functional properties of sperm have been intensively developed. This review considers a quantitative electron microscopic technique of sperm (EMTS), which assesses the structure and function of the sperm penetration and motor apparatus. The detection of sperm chromatin structural disorders can understand the causes of early embryonic malformation. Indications for EMTS and interpretation of its results are given.

Key words: sperm ultrastructure, sperm chromatin, acrosome, asthenozoospermia

Введение

Традиционное изучение показателей спермограммы остается основным видом обследования мужчин при нарушениях фертильности. Ведущими показателями, отражающими оплодотворяющую способность спермы, считаются концентрация сперматозоидов (их общее количество), подвижность и содержание сперматозоидов нормальной (типичной) морфологии [1]. Хотя у фертильных мужчин эти показатели в общем выше, чем у бесплодных, тем не менее в группе фертильных и бесплодных мужчин они могут значительно перекрываться, позволяя предполагать наличие неких важных, но не учитываемых в традиционной диагностике факторов, влияющих на фертильность [2]. В связи с этим в последние годы интенсивно развиваются методы исследования функциональных свойств сперматозоидов, определяющих их репродуктивный потенциал.

Ультраструктурная организация нормальных сперматозоидов была подробно описана еще 40 лет назад, в годы бурного развития электронной микроскопии [3]. Морфологи пришли к выводу, что уникальная структура сперматозоида идеально приспособлена для выполнения его основной и, как тогда считалось, единственной функции — переноса мужского генома в яйцеклетку [4]. Однако исследования последних десятилетий показывают, что сперматозоиды — не просто «извозчики», переносящие мужской геном в ооцит. Сейчас стало понятно, что помимо переноса «генетической информации» сперматозоиды принимают участие в таких процессах, как сингамия (слияние мужского и женского ядер), активация ооцита, эпигенетическая регуляция развития раннего эмбриона.

Достижения современной молекулярной биологии, цитологии и генетики дают возможность определить морфологический субстрат почти для каждой

функции сперматозоида. В частности, они дают понимание того, что морфология сперматозоидов является показателем их компетентности как в процессе собственно оплодотворения (проникновения сперматозоида в яйцеклетку), так и в процессе эмбриогенеза.

Метод количественного электронно-микроскопического исследования сперматозоидов (ЭМИС) позволяет исследовать морфологические субстраты подвижности и пенетрационной способности сперматозоидов, компетентности в раннем эмбриогенезе. Заключение по спермограмме «тератозооспермия» определяет только аномальную форму сперматозоидов, но не позволяет выявить морфологическую основу их функциональной некомпетентности [5], тем более что и сперматозоиды нормальной формы могут быть функционально недостаточными.

Исследование аномалий ультраструктуры сперматозоидов дает возможность не только выявить причину бесплодия, но и определить тактику клинициста: выбрать терапию, рекомендовать вспомогательные репродуктивные технологии (ВРТ) либо (в случае вероятности наследования аномалии) предложить использование донорских сперматозоидов.

1. Ядро сперматозоидов

Большую часть головки сперматозоида занимает ядро с плотным конденсированным хроматином (рис. 1), его плотность по крайней мере в 10 раз превышает плотность хроматина соматических клеток [6].

Чтобы достигнуть такой уникальной степени компактизации, ДНК сперматозоидов упаковывается специфическим образом, который значительно отличается от упаковки хроматина соматических клеток. В процессе спермиогенеза гистоны заменяются транзитными протеинами, а затем более основными и более мелкими белками с высоким положительным зарядом — протаминами, содержащими большое количество аргинина и цистеина [7]. Компактизация протаминизированно-

го хроматина обеспечивает его метаболическую инактивацию, с одной стороны, и механическую и химическую стабильность, с другой, защищая отцовский геном от действия нуклеопротеаз во время прохождения сперматозоидов через мужские и женские половые пути и во время взаимодействия с ооцитом.

В зрелых сперматозоидах человека 10–15 % ДНК генома остаются свободными от протаминов и сохраняют нуклеосомную структуру [8]. До недавнего времени роль этих остаточных нуклеосом оставалась неясной. Недавно стало понятно, что остаточные нуклеосомы — не просто случайные остатки неэффективной протаминизации. Распределение генов в протаминизированных и гистоновых (нуклеосомных) районах хроматина подчиняется определенному порядку.

Протамины обеспечивают отсутствие экспрессии генов и защиту от действия экзогенных факторов, а «остаточные» нуклеосомы маркируют гены, кодирующие факторы раннего развития эмбрионов [8–10].

Аномалии конденсации хроматина. В эякуляте фертильных мужчин — доноров спермы практически всегда выявляются сперматозоиды с незавершенной конденсацией хроматина в ядрах эякулированных сперматозоидов. В таких клетках выявляются гранулярно-фибриллярные нуклеопротаминовые комплексы диаметром около 40 нм. Подобная структура хроматина сперматозоидов морфологически идентична хроматину удлиненных сперматид, вследствие чего для описания подобных сперматозоидов употребляют термин «незрелый хроматин» (НХ) (рис. 2).

У фертильных доноров спермы содержание сперматозоидов с гранулярно-фибриллярным НХ не превышает 28 % и в среднем составляет 12 % [11]. У пациентов с нарушениями фертильности содержание сперматозоидов с НХ может достигать 80 % [12].

Возможная причина патологического значения нарушения компактизации хроматина — в нарушении эпигенетической регуляции раннего эмбриогенеза при

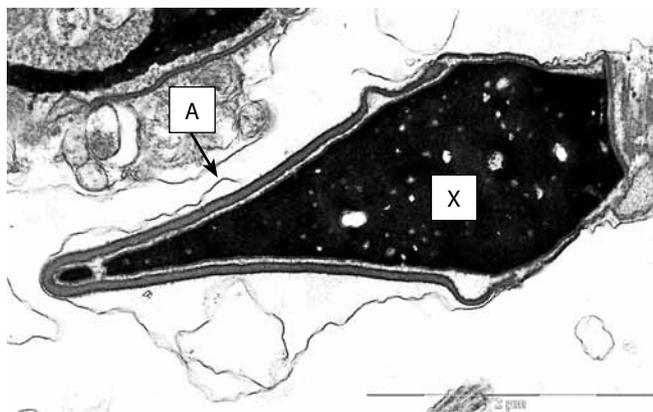


Рис. 1. Продольный срез через головку нормального сперматозоида. В ядре электронно-плотный конденсированный хроматин (X), акросома (A) покрывает 2/3 ядра

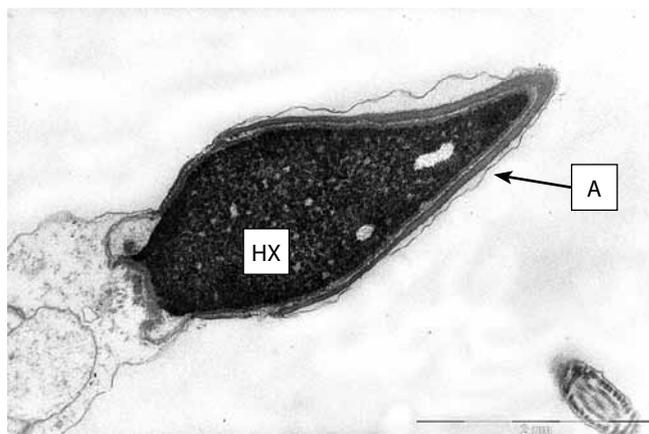


Рис. 2. Сперматозоид с нормальной формой головки и нормальной акросомой (A). В ядре — недостаточно конденсированный НХ

оплодотворении. В недавней работе S.S. Hammoud et al. [13] было показано, что при нарушении протаминизации у инфертильных пациентов наблюдается случайное распределение в геноме нуклеосомного (т.е. связанного с гистонами и потенциально активного) хроматина, в отличие от запрограммированного распределения нуклеосомного хроматина у фертильных мужчин. Проблема еще далека от разрешения, однако ясно, что нарушение процесса ремоделирования хроматина сперматозоидов может приводить к существенным нарушениям после оплодотворения.

Терапия препаратами фолликулостимулирующего гормона (ФСГ) у пациентов с повышенным содержанием сперматозоидов с НХ позволяет нормализовать состояние хроматина и улучшить результаты применения ВРТ [14, 15].

Возникает вопрос – есть ли связь между нарушением конденсации хроматина сперматозоидов и фрагментацией ДНК?

Нам не удалось обнаружить корреляции аномальной упаковки хроматина в сперматозоидах и количества выявляемых по методу TUNEL разрывов ДНК [16]. R. Henkel et al. [17] считают, что мнение о том, что нарушение протаминизации и, следовательно, конденсации хроматина автоматически ведет за собой повышение фрагментации ДНК сперматозоидов, должно быть пересмотрено.

Наличие в эякуляте большого количества сперматозоидов, содержащих недостаточно конденсированный НХ, является самостоятельным диагностическим признаком и не связано с повышенным содержанием сперматозоидов с фрагментацией ДНК [16]. Клинически и при повышенном содержании в эякуляте сперматозоидов с НХ, и при повышенном содержании сперматозоидов с фрагментацией ДНК выявляется повышенный риск спонтанного аборта в первом триместре беременности, однако природа этих нарушений различна. Первоначальная дискриминация повреждений генетического материала сперматозоидов позволяет применять терапию, соответствующую выявленной аномалии, – препараты ФСГ при нарушении конденсации хроматина [18], антиоксидантные препараты при повышенном содержании сперматозоидов с фрагментацией ДНК [19].

II. Акросома

Акросома – это секреторный пузырек, который формируется из пузырьков зоны Гольджи, начиная с ранних этапов спермиогенеза. Акросома расположена в виде шапочки на переднем полюсе ядра (см. рис. 1). В матриксе акросомы локализованы протеолитические ферменты, которые участвуют во взаимодействии сперматозоида и яйцеклетки и обеспечивают проникновение через zona pellucida (ZP) [20].

Между акросомой и ядерной оболочкой находится тонкий слой вещества средней электронной плотно-

сти – **перинуклеарная тека** (ПТ). В постакросомном сегменте ПТ выявлен комплекс белков, которые считаются фактором активации ооцитов [21]. Высвобождение фактора активации ооцитов из головки сперматозоида в цитоплазму ооцита ведет к активации ооцита, включая завершение мейоза, развитие пронуклеуса и защиту от полиспермии.

Аномалии акросомы. Электронно-микроскопическое исследование акросомы представляет собой экспериментально обоснованную альтернативу пенетрационных тестов. С помощью этого метода надежно выявляется целостность акросомы, состояние ее ферментного аппарата и постакросомного сегмента, участвующего в прикреплении сперматозоида к яйцеклетке. Выявление в эякуляте повышенного содержания сперматозоидов с аномальной акросомой может быть объяснением идиопатического бесплодия, даже при нормативных параметрах спермограммы.

При количественном ЭМИС мы оцениваем следующие параметры акросомы.

1. Первичное или вторичное отсутствие акросомы. Потеря акросомы считается первичной, если она вызвана нарушениями процесса спермиогенеза. Классическим примером первичного отсутствия акросомы является глобулозооспермия с предполагаемой генетической природой заболеваний.

Вторичная потеря акросомы – результат преждевременно произошедшей акросомной реакции, т.е. разрушения существующей акросомы (рис. 3а). В последнем случае наблюдается разрушение плазматической мембраны, на поверхности сперматозоида в акросомной зоне выявляется ядерная оболочка. При физиологической акросомной реакции в живом сперматозоиде сохраняются постакросомный сегмент и плазматическая мембрана постакросомного сегмента. В эякуляте фертильных пациентов количество сперматозоидов с прореагировавшей акросомой не превышает 20 %. Выявление в эякуляте повышенного (более 20 %) содержания сперматозоидов с прореагировавшей акросомой (с деградацией акросомы) может быть причиной снижения фертилизационной способности эякулята.

К преждевременной акросомной реакции сперматозоидов может приводить наличие в эякуляте бактериальных микроколоний и/или лейкоспермия [22].

Повышенное содержание сперматозоидов с прореагировавшей акросомой позволяет рекомендовать клиницистам применение соответствующего курса терапии. Лечение воспалительных заболеваний и антиоксидантная терапия позволяет нормализовать структуру акросомы.

2. Расширение субакросомного пространства, отсутствие ПТ и постакросомного сегмента (рис. 3б).

В эякуляте фертильных мужчин обнаруживается 2–5 % сперматозоидов с отсутствием постакросомного сегмента ПТ, однако в некоторых случаях такие

сперматозоиды могут составлять более половины клеточной популяции, что, по-видимому, является причиной идиопатического бесплодия при нормальных параметрах традиционного спермиологического исследования.

Внедрение метода интрацитоплазматической инъекции сперматозоида (ИКСИ) могло бы решить вопрос для этих пациентов, но не во всех случаях. При отсутствии активации ооцитов с различной степенью успеха применяются методы стимуляции потока Ca^{2+} в ооцит стронцием, электрическими зарядами, инкубацией с ионоформой кальция [23].

3. *Гипоплазия акросомы* (рис. 3в, г) и отсутствие внутреннего содержимого (ферментная недостаточность акросомы) встречаются как при выраженной тератозооспермии, так и при нормозооспермии. Гипоплазия акросомы — частый компонент выраженной тератозооспермии, хорошо распознается при электронно-микроскопическом изучении и должна быть диагностирована, поскольку недостаточность функции акросомы можно корректировать использованием ИКСИ.

III. Жгутик

Жгутик обеспечивает подвижность сперматозоидов. Морфологической основой подвижности ресничек и жгутиков всех эукариотических (имеющих ядро) клеток является аксонема, которая в сперматозоиде тянется вдоль всего жгутика. Аксонема состоит из 9 пар периферических микротрубочек, расположенных по окружности (дуплетов микротрубочек), и одной пары центральных микротрубочек, описывается формулой

(9+2). От каждого дуплета отходят так называемые «динеиновые ручки», обладающие АТФазной активностью. Центральная пара микротрубочек (центральный дуплет) соединена с периферическими дуплетами радиальными спицами (рис. 4а). Характерной особенностью жгутика сперматозоида, в отличие от ресничных структур, является наличие так называемых периаксонемных структур (рис. 4б–г) — наружных плотных фибрилл и митохондриального слоя в среднем отделе жгутика, фиброзной оболочки в основном отделе жгутика. Митохондрии расположены по спирали вокруг аксонемы и обеспечивают сперматозоиды энергией при относительно аэробных условиях. В фиброзной оболочке обнаружены ферменты гликолиза, обеспечивающие сперматозоиды энергией в анаэробных условиях женских половых путей [24].

Аномалии структуры жгутика. Аномалии структуры жгутиков можно разделить на 2 основные группы — так называемые «функциональные» и генетически обусловленные «синдромные» формы патоспермии, такие как первичная цилиарная дискинезия (ПЦД), дисплазия фиброзной оболочки (ДФО) или аномалии структуры митохондрий.

Наиболее распространенной является «функциональная» форма астенозооспермии. При этом наблюдаются многообразные гетерогенные изменения ультраструктуры аксонемы (рис. 5) и периаксонемных структур — изменение количества дуплетов микротрубочек, изменение формы наружных плотных фибрилл или архитектуры фиброзной оболочки. В эякуляте фертильных мужчин количество сперматозоидов с морфологическими атипиями аксонемы жгутиков

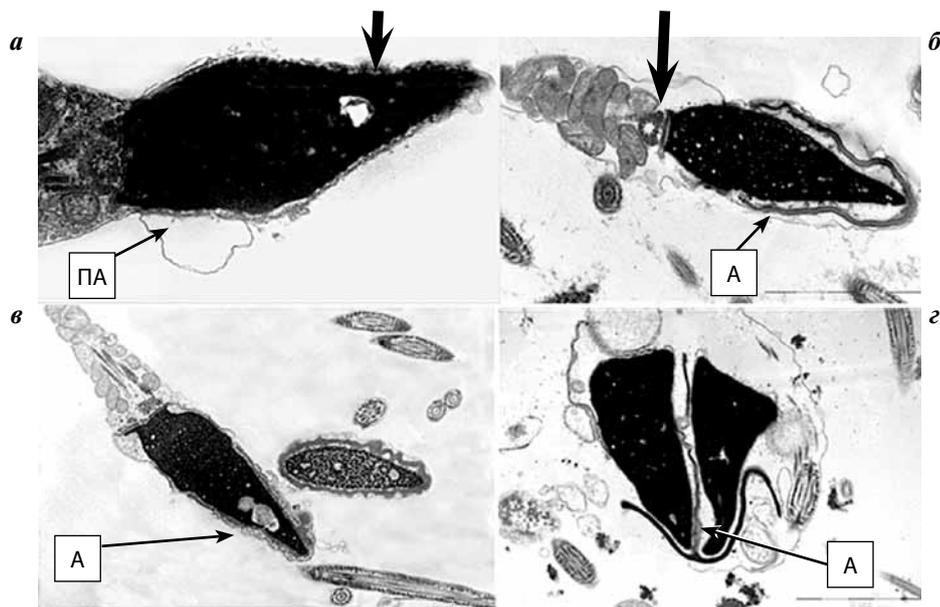


Рис. 3. Сперматозоиды с нормальной формой головки и аномальной морфологией акросомы (А): а — сперматозоид с прореагировавшей акросомой (стрелка) и сохранным постакросомным сегментом ПТ (ПА); б — сперматозоид с расширенным субакросомным пространством и отсутствием постакросомного сегмента (стрелка); в — гипоплазия акросомы, акросома неправильной формы с неравномерно распределенным веществом акросомного матрикса; г — двухдерный сперматозоид с Т-образной акросомой

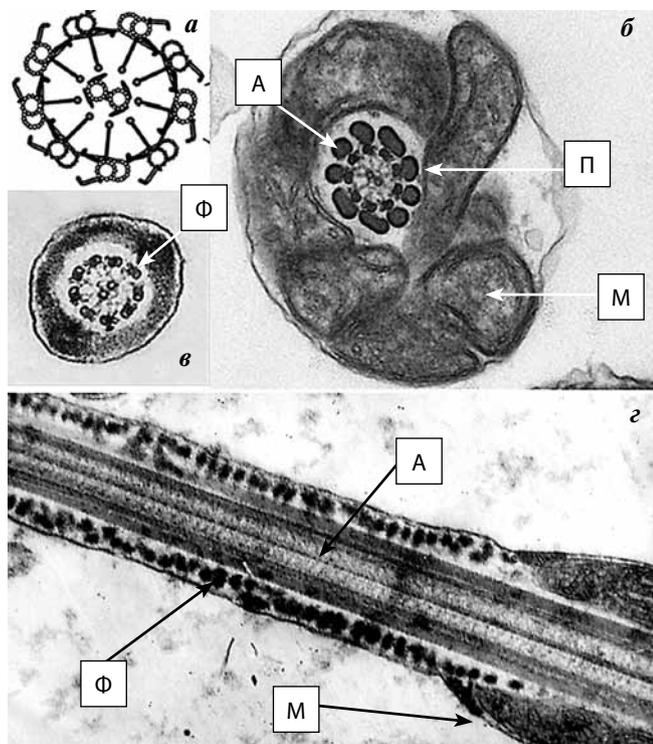


Рис. 4. Структура нормального жгутика сперматозоида: а – схема строения аксонемы (9+2); б – поперечный срез через средний отдел жгутика. Аксонема (А) окружена 9 наружными плотными фибриллами (П) и митохондриями (М); в – поперечный срез жгутика через основной отдел жгутика. Аксонема окружена фиброзной оболочкой (Ф); г – продольный срез через переходную зону между средним и основным отделами жгутика

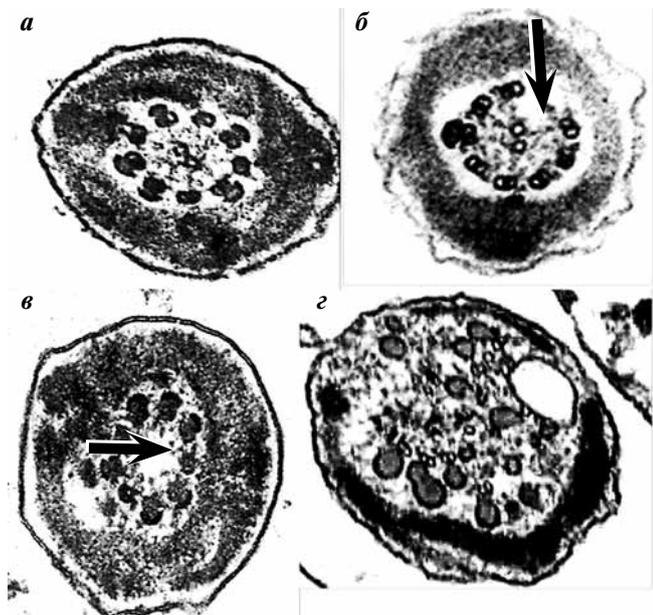


Рис. 5. Поперечные срезы через жгутики сперматозоидов аномальной морфологии из эякулята пациентов с различной степенью астенозооспермии: а – отсутствие «динеиновых ручек» аксонемы; б – отсутствие одного дуплета аксонемы (8+2) (стрелка); в – отсутствие центральной пары микротрубочек аксонемы (9+0) (стрелка); г – дезорганизация микротрубочек аксонемы и наружных плотных фибрилл

не превышает 30 %, с атипиями фиброзной оболочки и наружных плотных фибрилл – 10 % [18]. Функциональная астенозооспермия может быть вторичным нарушением при варикоцеле, инфекционных заболеваниях органов репродуктивной системы, экзогенных воздействиях [25]. Описано нарушение ультраструктуры аксонемы жгутиков у наркоманов [26]. При выявленной функциональной астенозооспермии возможна терапевтическая коррекция показателей спермограммы. При отсутствии эффекта терапии имеется хороший прогноз для проведения ИКСИ.

Иная ситуация наблюдается у пациентов с генетически обусловленной астенозооспермией.

ПЦД – редкое генетически гетерогенное заболевание с аутосомально-рецессивным наследованием, которое характеризуется врожденными аномалиями структуры и функции подвижных ресничек и жгутиков, включая сперматозоиды и реснички респираторных тканей [27].

ДФО жгутиков сперматозоидов – генетически обусловленное заболевание, характеризующееся выраженной или тотальной астенозооспермией. На ультраструктурном уровне заболевание характеризуется хаотичным расположением колонн и ребер фиброзной оболочки в аксонеме жгутика сперматозоидов (рис. 6а) [28]. Во многих случаях отмечают семейный характер ДФО. Нарушения структуры фиброзной оболочки часто сочетаются с нарушением структуры аксонемы (рис. 6б). В этих случаях возможно говорить о сочетании ПЦД и ДФО.

Внедрение технологии ИКСИ сделало возможным получение потомства у мужчин с выраженной астенозооспермией, в том числе и с генетически обусловленными ее формами. Следует учитывать потенциальную опасность перенесения аномалии потомству. Так, показано, что у пациентов с ПЦД в 200 раз по сравнению с общей популяцией повышен риск возникновения бронхолегочных и сердечно-сосудистых заболеваний [29]. Немногочисленность случаев ИКСИ и ДФО, закончившихся рождением ребенка, не позволяет сделать заключение о реальном наследовании цилиарных аномалий [30].

Соединительный участок (шейка) сперматозоида соединяет головку и жгутик. У основания головки выявляется тонкая базальная пластина. Под базальной пластиной расположены 9 исчерченных колонн, непосредственным продолжением которых являются наружные плотные фибриллы и центриоль, заключенная в электронно-плотный капитулум (рис. 7). Центриоль – универсальный компонент эукариотических животных клеток – необходима для формирования веретена деления при митозе. Проксимальная центриоль представляет собой цилиндр, состоящий из 9 компонентов, каждый из которых содержит 3 микротрубочки (триплеты).

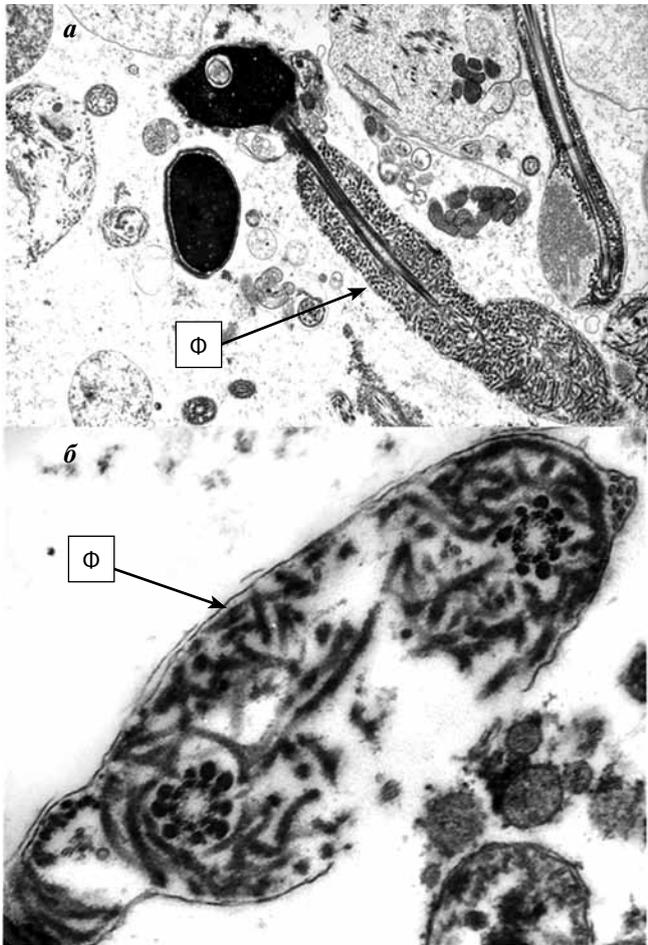


Рис. 6. Сперматозоиды пациента с абсолютной астенозооспермией: а – продольный срез через сперматозоид с аморфной головкой, отсутствием митохондриальной спирали и ДФО (Ф); б – срез через жгутик сперматозоида с ДФО (Ф) и отсутствие центральной пары микротрубочек аксонемы (стрелка)

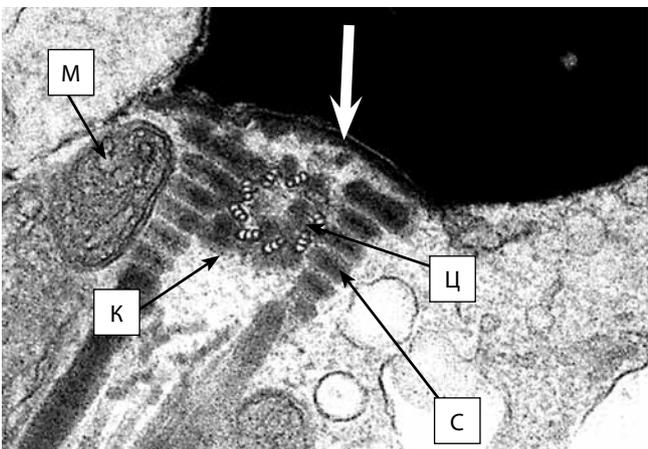


Рис. 7. Продольный срез через нормальный сперматозоид. У основания головки центриоль (Ц), состоящая из 9 триплетов микротрубочек, окружена электронно-плотным материалом (капитулум, К) и исчерченными столбиками (С), переходящими в наружные плотные фибриллы. У основания ядра сперматозоида – базальная пластина (стрелка). М – митохондрия

Проксимальная центриоль сперматозоида после оплодотворения попадает в яйцеклетку и участвует в создании веретена дробления [31].

Аномалии центросомы описаны как причина неудач оплодотворения и аномального эмбрионального развития [32, 33].

Синдром ацефалических сперматозоидов является генетически обусловленной формой патозооспермии, связанной с нарушенным соединением головки и жгутика.

Внутригаметное вирусное инфицирование сперматозоидов. С помощью трансмиссионной электронной микроскопии в ядре и в цитоплазматической капле инфицированных сперматозоидов мы обнаруживали вирусные капсиды, морфологически идентичные капсидам вируса простого герпеса (ВПГ) [34, 35] (рис. 8). Герпетическая природа выявленных капсидов была подтверждена с помощью гибридизации *in situ* и реакции иммунофлюоресценции [36, 37]. Инфицирование выявлено как в общей фракции сперматозоидов, так и в выделенной фракции подвижных сперматозоидов. Сохранение генома ВПГ в подвижных морфологически нормальных сперматозоидах позволяет предполагать возможность вертикальной передачи вируса потомству во время оплодотворения естественным путем или при применении различных методик вспомогательных репродуктивных технологий, включая экстракорпоральное оплодотворение (ЭКО)/ИКСИ.

Герпетическое инфицирование сперматозоидов статистически значимо чаще выявляется в группе infertильных мужчин, а также мужчин, у жен которых в анамнезе было спонтанное прерывание беременности или неудачи применения методов ВРТ, по сравнению с группой фертильных мужчин [38–40].

Проведение специфической антигерпетической терапии в случае выявления внутриклеточного герпетического инфицирования сперматозоидов позволяет существенно, почти в 5 раз, улучшить показатели успешного развития blastocист после ИКСИ и наступления клинической беременности при применении ВРТ [41].

Бактериальное инфицирование эякулята. В эякуляте пациентов с нарушениями фертильности выявляются бактериальные колонии, в которых гетероморфные микроорганизмы соединены волокнистым веществом, по-видимому, полисахаридной природы, по типу бактериальных биопленок. Большая часть микроколоний прикреплена к клеткам плоского эпителия, но также микроколонии могут прикрепляться к головкам или жгутикам сперматозоидов (рис. 9).

E. Moretti et al. [42] при исследовании образцов эякулята пациентов с нарушением фертильности наиболее часто выявляли *Enterococcus faecalis* и *Escherichia coli*, а также *Streptococcus agalactiae*, *Ureaplasma urealyticum*, *Staphylococcus epidermidis*, *Streptococcus anginosus*, *Morganella morganii*. Все эти микроорганизмы, кроме *U. urea-*

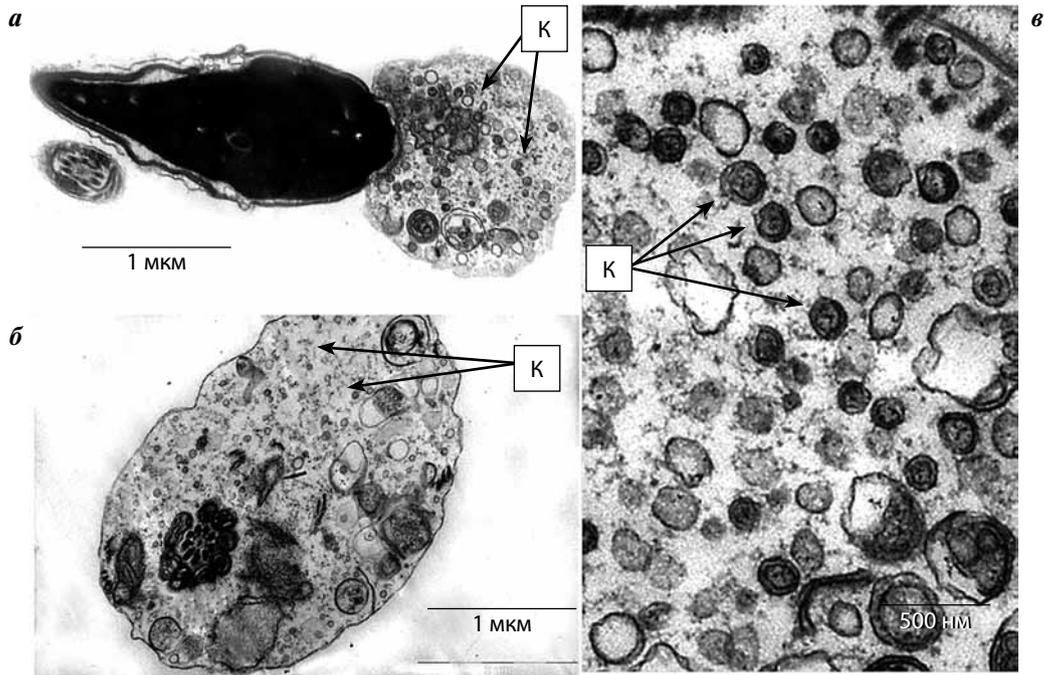


Рис. 8. Вирусные капсиды (К) в сперматозоидах: а – продольный срез через сперматозоид; б – поперечный срез через средний отдел жгутика. В цитоплазме сперматозоидов видны вирусные капсиды; в – капсиды имеют двойную мембрану и гексагональную форму

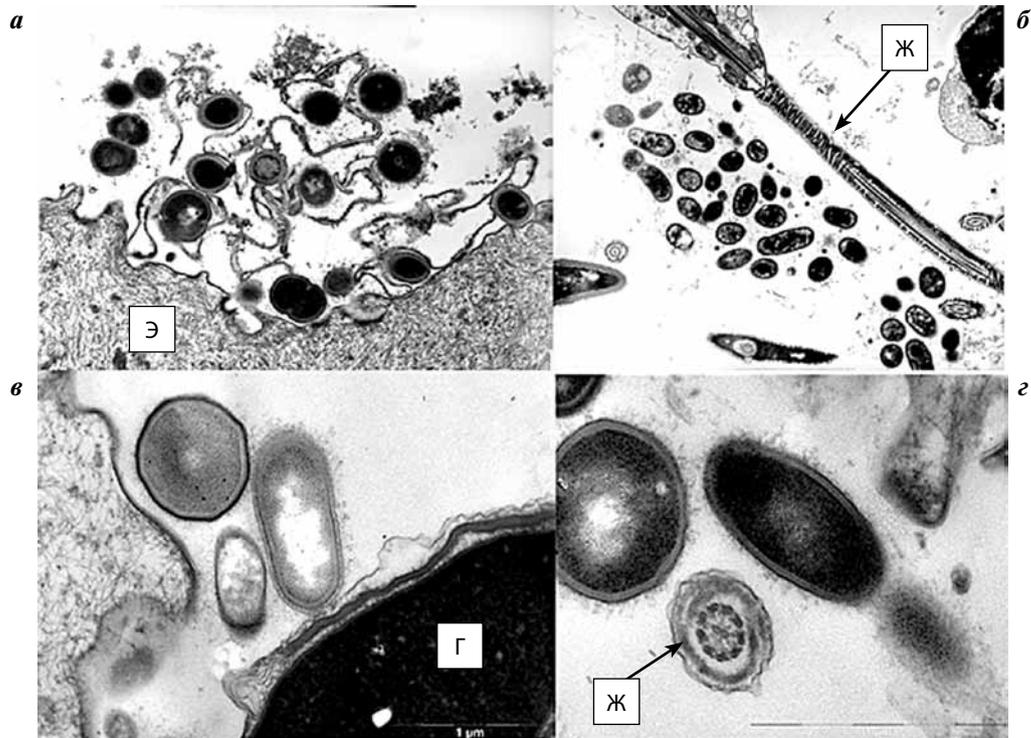


Рис. 9. Бактериальное инфицирование эякулята: а – бактериальная микроколония на эпителиальной клетке (Э). Микроколония окружена мембранными структурами; б, г – бактериальные микроколонии прикреплены к жгутику сперматозоидов (Ж); в – бактериальная микроколония прикреплена к головке сперматозоида (Г)

lyticum, считаются неспецифической сапрофитной микрофлорой, их наличие не определяют при стандартном обследовании по поводу бесплодия.

Бактерии могут оказывать повреждающее действие на сперматозоиды даже в отсутствие выраженной воспалительной реакции. Мы показали повышенное



Интерпретация результатов ЭМИС

Результат ЭМИС	Заключение
1. Содержание сперматозоидов с недостаточно конденсированным НХ более 30 %	Следствие – повышенная вероятность спонтанного аборта в первом триместре беременности у жены пациента, остановка развития эмбриона при применении ВРТ. Причиной могут быть генетические нарушения (редкая форма атипии) либо действие экзогенных факторов. В последнем случае возможна терапевтическая коррекция
2. Содержание сперматозоидов с прореагировавшей акросомой более 20 %	Следствие – неспособность сперматозоидов проникнуть в яйцеклетку (отсутствие оплодотворения). Причиной могут быть воспалительные заболевания урогенитального тракта, повышенное содержание активных форм кислорода. Возможна терапевтическая коррекция. Альтернатива пенетрационных тестов
3. Содержание сперматозоидов с расширенным субакросомным пространством и/или отсутствием пост-акросомного сегмента ПТ более 20 %	Следствие – отсутствие фактора активации ооцитов. В яйцеклетке не завершается мейотическое деление, проникновения сперматозоида в яйцеклетку не происходит. Плохо изученная форма патозооспермии, доказана в эксперименте на мышах. Предполагается, что возможна ИКСИ с активацией ооцита
4. Содержание сперматозоидов с гипоплазией акросомы больше 60 %	Следствие – неспособность сперматозоидов проникнуть в яйцеклетку (отсутствие оплодотворения). Причина не известна, атипия, скорее всего, носит функциональный характер. Возможна связь с нарушениями процесса сперматогенеза
5. Тотальное отсутствие акросомы или зачаточные акросомы в сочетании с округлой формой сперматозоидов – глобулозооспермия	Неспособность сперматозоидов проникнуть в яйцеклетку (отсутствие оплодотворения). Генетически обусловленная атипия, терапевтическая коррекция морфологии сперматозоидов не дает результатов. Редкая форма атипии. Применение ИКСИ возможно, необходима активация ооцитов. Более благоприятный прогноз при использовании в ИКСИ сперматозоидов с зачаточной акросомой. Возможно наследование аномалии после применения ИКСИ (не доказано)
6. Содержание интактных головок сперматозоидов (т. е. головок нормальной формы с нормальной морфологией акросомы, конденсированным хроматином и отсутствием крупных вакуолей, занимающих более 1/3 площади ядра) менее 4 %	Тактика клиницистов зависит от характера выявленной атипии. В тех случаях, когда выявлено повышенное содержание сперматозоидов с НХ или прореагировавшей акросомой, – терапия (см. пункты 1, 2). При тотальной аномальной форме ядер сперматозоидов и гипоплазии акросомы – выявление сопутствующих заболеваний. При отсутствии эффекта терапии – применение ВРТ
7. Гетерогенные аномалии морфологии аксонемы и периаксонемных структур жгутиков сперматозоидов – функциональная астенозооспермия (атипия больше 30 %)	Вероятная причина – действие экзогенных факторов. Возможна терапевтическая коррекция
8. Выявлено 70 % или более однотипных аномалий морфологии аксонемы жгутика – отсутствие наружных или внутренних «динейновых ручек», центральной пары микротрубочек – у пациентов с тотальной астенозооспермией. Синдром ПЦД	Генетически обусловленная атипия, терапевтическая коррекция подвижности сперматозоидов не дает результатов. После применения ИКСИ повышен риск развития бронхолегочных и сердечно-сосудистых заболеваний. Редкая форма атипии
9. Выявлено 70 % или более однотипных аномалий морфологии фиброзной оболочки жгутика, часто в сочетании с нарушением структуры аксонемы (отсутствие центральной пары микротрубочек, 9+0) у пациентов с тотальной астенозооспермией. ДФО	Генетически обусловленная атипия, терапевтическая коррекция подвижности сперматозоидов не дает результатов. Возможно наследование аномалии после применения ИКСИ. При сочетании ДФО и атипии аксонемы (9+0) риски такие же, как и при ПЦД. Редкая форма атипии
10. Выявляется 70 % или более однотипных аномалий морфологии митохондриальных жгутиков сперматозоидов у пациентов с тотальной астенозооспермией	Генетически обусловленная атипия, терапевтическая коррекция подвижности сперматозоидов не дает результатов. Митохондрии наследуются по материнской линии, риск наследования аномалии после ИКСИ минимален. Редкая форма атипии
11. Более чем в 3 % случаев в сперматозоидах выявлены внутригаджетные капсулы вирусов герпеса	Следствие – повышенная вероятность спонтанного аборта в первом триместре беременности жены пациента, вероятность замершей беременности, остановки развития эмбриона при применении ВРТ. Возможна терапевтическая коррекция
12. В эякуляте выявлены бактериальные микроколонии, прикрепленные к эпителиальным клеткам или к сперматозоидам	Возможно (в зависимости от клинических симптомов) назначение антибактериальной терапии. Наличие межклеточного вещества в микроколониях определяет применение антибактериальных и мукоцидных препаратов

содержание сперматозоидов с прореагировавшей акросомой (т. е. с преждевременно прошедшей акросомной реакцией) у пациентов с наличием в сперме бактериальных микроколоний. Наличие бактерий оказывает повреждающее действие на митохондрии сперматозоидов [43].

Заключение

Несмотря на успехи молекулярной биологии, морфологические методы исследования продолжают играть большую роль при установлении диагноза при нарушении фертильности мужчин. Диагностическая ценность количественного ЭМИС определяется тем, что этот метод позволяет определять структуру компонентов сперматозоидов с известными функциями, давая картину структурно-функциональной целостности клеток.

Показаниями для применения ЭМИС являются:

1) идиопатическое бесплодие при нормозооспермии или при небольших отклонениях показателей

спермограммы (выявление аномалий сперматозоидов, не видимых при традиционном спермиологическом исследовании);

2) обследование пациентов, у жен которых в анамнезе были спонтанные аборт в первом триместре беременности или замершая беременность, неудачные попытки ЭКО/ИКСИ;

3) дифференциальная диагностика генетически обусловленных и функциональных форм патозооспермии при выраженной астено- и тератозооспермии.

Референсные значения для основных показателей ультраструктуры сперматозоидов человека были установлены на основании изучения эякулята доноров спермы [44, 45]. Изменения референсных значений в исследуемом эякуляте являются следствием тех или иных патологических процессов. Понимание характера выявленной патологии позволяет назначить этиотропную терапию, выбрать метод ВРТ либо предупредить пациента о возможности наследования аномалии в случае генетически обусловленной патозооспермии (таблица).

ЛИТЕРАТУРА

1. WHO laboratory manual for the Examination and processing of human semen. Fifth edition. World Health Organization, 2010.
2. Evenson D.P., Jost L.K., Marshall D. et al. Utility of the sperm chromatin structure assay as a diagnostic and prognostic tool in the human fertility clinic. *Hum Reprod* 1999;14(4):1039–49.
3. Fawcett D.W. The mammalian spermatozoon. *Dev Biol* 1975;44(2):394–436.
4. Zamboni L. Sperm structure and its relevance to infertility. An electron microscopic study. *Arch Pathol Lab Med* 1992;116(4):325–44.
5. Kruger T.F., Menkveld R., Stander F.S. et al. Sperm morphologic features as a prognostic factor in vitro fertilization. *Fertil Steril* 1986;46:1118–32.
6. Braun R.E. Packaging paternal chromosomes with protamine. *Nat Genet* 2001;28:10–2.
7. Oliva R. Protamines and male infertility. *Hum Reprod Update* 2006;12(4):417–35.
8. Brykczynska U., Hisano M., Erkek S. et al. Repressive and active histone methylation mark distinct promoters in human and mouse spermatozoa. *Nat Struct Mol Biol* 2010;17(6):679–87.
9. Hammoud S., Liu L., Carrell D. Protamine ratio and the level of histone retention in sperm selected from a density gradient preparation. *Andrologia* 2009;41:88–94.
10. Arpanahi A., Brinkworth M., Iles D. et al. Endonuclease-sensitive regions of human spermatozoal chromatin are highly enriched in promoter and CTCF binding sequences. *Genome Res* 2009;19:1338–49.
11. Бочарова Е.Н., Брагина Е.Е., Гусак Ю.К. Количественное ультраструктурное исследование сперматозоидов человека при нарушениях фертильности. *Вестн нов мед технол* 2007;24(4):199–201.
12. Брагина Е.Е., Замятнина В.А., Бочарова Е.Н. и др. Количественное ультраструктурное исследование хроматина сперматозоидов при нарушении фертильности. *Андрол и генит хир* 2009;1:44–9.
13. Hammoud S.S., Nix D.A., Hammoud A.O. et al. Genome-wide analysis identifies changes in histone retention and epigenetic modifications at developmental and imprinted gene loci in the sperm of infertile men. *Hum Reprod* 2011;26:2558–69.
14. Ben-Rafael Z., Farhi J., Feldberg D. et al. Follicle-stimulating hormone treatment for men with idiopathic oligoteratoasthenozoospermia before *in vitro* fertilization: the impact on sperm microstructure and fertilization potential. *Fertil Steril* 2000;73(1):24–30.
15. Baccetti B., Piomboni P., Bruni E. et al. Effect of follicle-stimulating hormone on sperm quality and pregnancy rate. *Asian J Androl* 2004;6(2):133–7.
16. Брагина Е.Е., Замятнина В.А., Гаврилов Ю.А. и др. Упаковка хроматина и фрагментация ДНК – два типа нарушений наследственного материала сперматозоидов. *Мед ген* 2009;8(10):29–35.
17. Henkel R., Hoogendijk C.F., Bouic P.J., Kruger T.F. TUNEL assay and SCSA determine different aspects of sperm DNA damage. *Andrologia* 2010;42(5):305–13.
18. Bartoov B., Eltes F., Pansky M. et al. Improved diagnosis of male fertility potential via a combination of quantitative ultramorphology and routine semen analyses. *Hum Reprod* 1994;9(11):2069–75.
19. Greco E., Iacobelli M., Rienzi L. et al. Reduction of the incidence of sperm DNA fragmentation by oral antioxidant treatment. *J Androl* 2005;26:49–53.
20. Ramalho-Santos J., Schatten G., Moreno R.D. Control of membrane fusion during spermiogenesis and the acrosome reaction. *Biol Reprod* 2002;67(4):1043–51.
21. Sutovsky P., Manandhar G., Wu A., Oiko R. Interactions of sperm perinuclear theca with the oocyte: implications for oocyte activation, anti-polyspermy defense, and assisted reproduction. *Microsc Res Tech* 2003;61(4):362–78.
22. Aitken R.J., West K.M. Analysis of the relationship between reactive oxygen species production and leucocyte infiltration in fractions of human semen separated on Percoll gradients. *Int J Androl* 1990;13(6):433–51.

23. Yanagida K., Morozumi K., Katayose H. et al. Successful pregnancy after ICSI with strontium oocyte activation in low rates of fertilization. *Reprod Biomed Online* 2006;13(6):801–6.
24. Miki K., Ou W., Goulding E. et al. Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase-S, a sperm-specific glycolytic enzyme, is required for sperm motility and male fertility. *Proc Natl Acad Sci USA* 2004;101:16501–6.
25. Chemes H.E., Rawe V.Y. Sperm pathology: a step beyond descriptive morphology. Origin, characterization and fertility potential of abnormal sperm phenotypes in infertile men. *Hum Reprod Update* 2003;9:405–28.
26. el-Shoura S.M., Abdel Aziz M., Ali M.E. et al. Deleterious effects of khat addiction on semen parameters and sperm ultrastructure. *Hum Reprod* 1995;10(9):2295–300.
27. Blouin J.L., Meeks M., Radhakrishna U. et al. Primary ciliary dyskinesia: a genome-wide linkage analysis reveals extensive locus heterogeneity. *Eur J Hum Genet* 2000;8:109–18.
28. Chemes H.E., Olmedo S.B., Carrere C. et al. Ultrastructural pathology of the sperm flagellum: association between flagellar pathology and fertility prognosis in severely asthenozoospermic men. *Hum Reprod* 1998;13(9):2521–6.
29. Kennedy M.P., Omran H., Leigh M.W. et al. Congenital heart disease and other heterotaxic defects in a large cohort of patients with primary ciliary dyskinesia. *Circulation* 2007;115(22):2814–21.
30. Dávila Garza S.A., Patrizio P. Reproductive outcomes in patients with male infertility because of Klinefelter's syndrome, Kartagener's syndrome, round-head sperm, dysplasia fibrous sheath, and 'stump' tail sperm: an updated literature review. *Curr Opin Obstet Gynecol* 2013;25(3):229–46.
31. Schatten H., Sun Q.-Y. The role of centrosomes in mammalian fertilization and its significance for ICSI. *Molecular Human Reprod* 2009;15(9):531–8.
32. Sathanathan A.H., Ratnasooriya W.D., de Silva P.K., Menezes J. Characterization of human gamete centrosomes for assisted reproduction. *Ital J Anat Embryol* 2001;106(Suppl 2):61–73.
33. Nakamura S., Terada Y., Horiuchi T. et al. Analysis of the human sperm centrosomal function and the oocyte activation ability in a case of globozoospermia, by ICSI into bovine oocytes. *Hum Reprod* 2002;7:2930–4.
34. Брагина Е.Е., Абдумаликов Р.А., Курило Л.Ф. и др. Выявление сперматозоидов, инфицированных вирусом простого герпеса. *Вестн дерматол и венерол* 2000;5:18–22.
35. Брагина Е.Е., Абдумаликов Р.А., Бочарова Е.Н. и др. Внутриклеточное инфицирование сперматозоидов человека вирусами группы герпеса. *Андрол и генит хир* 2002;3:81–2.
36. Бочарова Е.Н., Абдумаликов Р.А., Брагина Е.Е. и др. Обнаружение белков и капсидов ВПГ в сперматозоидах человека. *ДАН* 2003;391(6):836–41.
37. Бочарова Е.Н., Завалишина Л.Э., Брагина Е.Е. и др. Выявление геномной ДНК вируса простого герпеса методом гибридизации *in situ* в сперматозоидах человека при нарушении фертильности. *ДАН* 2007;412(3):417–21.
38. Бочарова Е.Н., Брагина Е.Е., Гусак Ю.К. и др. Герпетическое инфицирование сперматозоидов при неудачах использования репродуктивных технологий и спонтанном прерывании беременности. *Урология* 2007;3:59–63.
39. Абдулмеджидова А.Г., Торганова И.Г., Витязева И.И. и др. Влияние бессимптомной формы герпес-вирусной инфекции на эффективность лечения бесплодия методами вспомогательных репродуктивных технологий. *Акуш и гин* 2009;1:45–8.
40. Kapranos N.C., Kotronias D.C. Detection of herpes simplex virus in first trimester pregnancy loss using molecular techniques. *In Vivo* 2009;23(5):839–42.
41. Брагина Е.Е., Виноградов И.В., Сухомлинова М.Ю. и др. Улучшение результатов ИКСИ у пациентов с внутрисперматозоидным герпетическим инфицированием сперматозоидов. *Андрол и генит хир* 2011;1:65–9.
42. Moretti E., Capitani S., Figura N. et al. The presence of bacteria species in semen and sperm quality. *J Assist Reprod Genet* 2009;26(1):47–56.
43. Barbonetti A., Vassallo M.R., Cinque B. et al. Soluble products of *Escherichia coli* induce mitochondrial dysfunction-related sperm membrane lipid peroxidation which is prevented by lactobacilli. *PLoS One* 2013;8(12):e83136.
44. Bartoov V., Eltes F., Reichart M. et al. Quantitative ultramorphological analysis of human sperm: fifteen years of experience in the diagnosis and management of male factor infertility. *Arch Androl* 1999;43(1):13–25.
45. Бочарова Е.Н., Брагина Е.Е., Гусак Ю.К. Количественное ультраструктурное исследование сперматозоидов человека при нарушениях фертильности. *Вестн новых мед технол* 2007; XXIV(4):199–201.