ОБЗОРНЫЕ СТАТЬИ

Review Articles

Обзор
УДК 616.64
DOI: 10.14489/lcmp.2021.02.pp.065-079

ЛАБОРАТОРНАЯ ДИАГНОСТИКА МУЖСКОГО БЕСПЛОДИЯ. МАРКЕРЫ И МЕТОДЫ. ЧАСТЬ II

Ж. Ю. Сапожкова^{1, 2}, Г. А. Милованова^{2, 3}, О. И. Пацап^{1, 4}

¹Международная Школа Цитологии и Медицинская Школа Инноваций, Москва, Россия, icsschool.2019@gmail.com

²Подольский диагностический центр, Подольск, Россия

³ФГБОУ ДПО «Российская медицинская академия непрерывного профессионального образования» Минздрава России, Москва, Россия, g.milovanova2018@gmail.com

⁴ФГБУ «Федеральный центр мозга и нейротехнологий» ФМБА, Москва, Россия, cleosnake@yandex.ru

Исследования последних лет изменили парадигму в отношении маркеров, методов и биологических образцов для лабораторной оценки мужского репродуктивного здоровья. Особое место в прегравидарной подготовке супружеской пары сегодня занимает образец «эякулят» и «осадок спермы» человека. Неинвазивное безболезненное получение этого вида биоматериала, а также наиболее широкий спектр диагностических находок, обнаруженных различными методами (цитологическим, молекулярно-биологическими и культуральным), подчеркивают важные преимущества биологического материала «эякулят» по сравнению с традиционными образцами – секретом предстательной железы и уретральным соскобом, полученными инвазивными процедурами – путем массажа и повреждением поверхностных и глубоких слоев слизистой уретры соответственно.

В обзоре также представлена современная ситуация с перечнем реагентов и анализаторов для определения маркеров мужского бесплодия и воспаления мужских добавочных половых желез согласно российскому реестру изделий медицинского назначения.

Ключевые слова: мужское бесплодие, методы, лабораторная диагностика, эякулят, осадок эякулята, цитология осадка эякулята, маркеры мужского бесплодия, анализаторы мужского бесплодия, лейкоциты спермы, спермограмма.

Для цитирования: Сапожкова Ж. Ю., Милованова Г. А., Пацап О. И. Лабораторная диагностика мужского бесплодия. Маркеры и методы. Часть II // Лабораторная и клиническая медицина. Фармация. 2021. Т. 1, № 2. С. 65 – 79. DOI: 10.14489/lcmp.2021.02.pp.065-079

Review

LABORATORY DIAGNOSTICS OF MALE INFERTILITY. BIOMARKERS AND METHODS. PART II

Zh. Yu. Sapozhkova^{1, 2}, G. A. Milovanova^{2, 3}, O. I. Patsap^{1, 4}

¹International Cytology School, Head, Senior Lecturer, Moscow, Russia

²Privat Medical Centre of Podolsk, Podolsk, Russia

³Russian Medical Academy of Continuous Professional Education, Moscow, Russia

⁴Federal Center of Brain Research and Neurotechnologies FMBA, Moscow, Russia

The new paradigm have been arise concerning to samples, markers and methods for assessment of male infertility. Nowadays, a sample “semen” and “sperm sediment” take a key role in examination and management of the subfertile couple. The advantages of sample “semen” such as non-invasive painless procedure as well as the wider range of diagnostic findings by number of methods (cytology, molecular and cultural) highlight the increasly importance of this diagnostic approach in comparison with conventional ones – prostate secretion and urethral scraping which obtained by invasive procedures – by massage and damaging a mucus membrane, respectively.

According to the Russian register this review also presents the current situation with the work list of kits and devices for assessment of male infertility and inflammatory of male accessory glands.

Key words: male infertility, methods, laboratory diagnostics, human semen, sperm sediment, human semen examination, sperm sediment cytology, biomarkers infertile male, laboratory devices male infertility, peroxidase positive cells.

For citation: Sapozhkova ZhYu, Milovanova GA, Patsap OI. Laboratory diagnostics of male infertility. Biomarkers and methods. Part II. *Laboratory and Clinical Medicine. Pharmacy*. 2021;1(2):65-79. (In Russ). DOI: 10.14489/lcmp.2021.02.pp.065-079

Исследования последних лет изменили парадигму в отношении маркеров, методов и биологических образцов для лабораторной оценки мужского репродуктивного здоровья. Особое место в прегравидарной подготовке супружеской пары сегодня занимает эякулят человека, комплексная оценка которого представляет большую диагностическую ценность, чем спермограмма. Многолетний теоретический и практический анализ методов лабораторного обследования пациентов мужского пола, представленный в действующих клинических рекомендациях (КР), стандартах первичной медико-санитарной помощи (СМСП) и других нормативно-правовых актах (НПА) Российской Федерации (РФ), указывает на диагностический кризис. Российские врачи на протяжении последнего десятилетия вынуждены строго соблюдать требования действующего регламента в лабораторной диагностике мужской субфертильности, инфертильности, инфекций мужских добавочных половых желез (МДПЖ), где прослеживаются серьезные терминологические и методические ошибки.

В связи с тем, что ключевую роль в установлении факта бесплодия мужчины играют методы клинической лабораторной диагностики, обеспечение выполнения одного из условий Национального проекта «Демография» 2018–2024 гг., а именно увеличение коэффициента рождаемости до 1,7 ребенка на одну женщину, представляется возможным при внедрении в практику усовершенствованных лабораторных технологий.

В целях укрепления междисциплинарного профессионального взаимодействия между специалистами клинической и лабораторной медицины продолжаем серию публикаций о маркерах и методах диагностики мужского репродуктивного здоровья, о преимуществах и недостатках традиционных подходов и о статусе инновационных средств диагностики.

Иммунная привилегия яичек (ИПЯ). Семенники взрослых млекопитающих состоят из двух

структурно различных областей: семенных канальцев и интерстициальных пространств между канальцами, соответствующих функциям сперматогенеза и стероидогенеза соответственно. В физиологических условиях семенники млекопитающих представляют собой уникальную иммунологическую среду, так называемую ИПЯ, где половые клетки защищены от эндогенной иммунной атаки, включая иммунный ответ от алло- и аутоантигенов [1, 2]. ИПЯ взаимосвязана с системной иммунной толерантностью, активной местной иммуносупрессией и местной анатомией яичек. Было показано, что защитные механизмы тестикул активно противодействуют экзогенным микробным патогенам из циркулирующей крови или из мочеполовых путей, которые пытаются преодолеть ИПЯ. Однако чрезмерный иммунный ответ от накопления системных иммунных клеток или нарушения местного иммунного гомеостаза между тестикулярной иммунной толерантностью и эффектом тестикулярного иммунного ответа может привести к мужской инфертильности на фоне воспалительного процесса [3 – 5]; точно так же, как вирусы иммунодефицита человека (ВИЧ) и эпидемического паротита (MuV) повреждают яички человека, что приводит к мужскому бесплодию [6, 7].

Клетки Сертоли (КС) составляют структурную платформу семенных канальцев, внутри которых проходят все стадии сперматогенеза. КС поддерживают ИПЯ, искажая иммунные ответы за счет экспрессии иммуносупрессивных молекул [8, 9] и иммуносупрессивных цитокинов, таких как трансформирующий фактор роста β (TGF- β), фактор некроза опухоли- α (TNF- α) и активированных [10 – 12], обнаруживаемых при системном и местном воспалении тестикул. Яички человека состоят из множества типов иммунных клеток: тестикулярных макрофагов, дендритных клеток, лимфоцитов, а также специфических для семенников клеток Лейдига.

Клетки Лейдига (КЛ) – еще одна большая часть интерстициальных клеток, как правило, нахо-

дящихся в непосредственной близости от иммунных клеток. Основная функция КЛ – это синтез тестостерона как для сперматогенеза, так и для органов-мишеней экстракестидулярных андрогенов. Кроме того, КЛ могут быть активированы для выработки иммунорегуляторных цитокинов, которые в свою очередь привлекают иммунные клетки, вероятнее всего ТМ, что приводит к нарушению гомеостаза в яичках и дефекту иммунного развития сперматогенных клеток [5].

Тестикулярные макрофаги (ТМ) – преобладающая популяция клеток в интерстициальном пространстве яичка, составляющая примерно 20 % всех интерстициальных клеток в нормальном семеннике. Известно, что в физиологических условиях ТМ секретирует небольшое количество провоспалительных цитокинов (TNF- α и интерлейкина-12 (IL-12)) в ответ на воспалительные сигналы, тогда как поддержание ИПЯ требует сопутствующей секреции высокой концентрации IL-10 [13, 14]. В особых условиях ТМ обладают динамическими свойствами и могут проявлять провоспалительную функцию (M1) или противовоспалительное действие (M2). Было показано, что во время вирусной инфекции передача сигналов цитокинов или распознавание патогенов продвигают поляризацию ТМ с фенотипа M2 на M1. Известно, что резидентные популяции M2 играют иммунорегуляторную роль в поддержании ИПЯ и трофических функций, особенно в КЛ, путем продуцирования цитокинов и хемокинов, включая IL-4, IL-10, TGF- β , хемокиновый лиганд 17 с мотивом CC (CCL17), CCL18 и CCL22. С другой стороны, во время острого и хронического воспаления, ТМ фенотипа M1 концентрируют иммунные клетки в очаг инфекции, искажая баланс цитокинов, тем самым стимулируя воспалительный ответ путем высвобождения цитокинов или хемокинов, включают интерферон γ (IFN- γ), IL-6, TNF- α , IL-1 β , CCL5 и хемокиновый лиганд 10 (CXCL10) мотивов CXC [13, 15 – 20].

Дендритные клетки, обычно известные как фагоциты, составляют десятую часть от количества ТМ, активно чувствуют в представлении антигена и в формировании адаптивного иммунитета. Более того, дендритные клетки могут не только помогать Т-клеткам, устойчивым к антигенам, минимизировать аутоиммунные ответы, но также активировать антиген-специфические Т-клетки, тем самым иницируя серию аутоиммунных реакций в яичках, ведущих к иммунологическому бесплодию [21, 22].

Лимфоциты составляют 10 – 20 % всех лейкоцитарных клеток, при этом большинство тести-

кулярных лимфоцитов представляют собой Т-клетки, состоящие в основном из CD8+, CD4+ и регуляторных Т-клеток (T-reg) [23, 24]. Воспалительные процессы в яичках сопровождаются значительным повышением количества Т-клеток, что является признаком нарушения иммунологического баланса. Смещение популяции лимфоцитов к T-reg-клеткам при аутоиммунном орхите [22] указывает на то, что эти клетки обладают мощным иммуносупрессивным действием, приводя к периферической толерантности. Кроме того, количество лимфоцитов в интерстициальном пространстве яичек тесно связано с количеством и активностью популяции ТМ за счет высвобождения цитокинов [23, 25].

В предыдущем обзоре упоминалось, что **антиспермальные антитела (АСА)** могут иммобилизовать или агглютинировать сперматозоиды, вызывая иммунные реакции, разрушающие ткань яичек, что может привести к бесплодию [26 – 28]. С одной стороны, данные публикации не подчеркивают значительное влияние АСА на объем эякулята, жизнеспособность сперматозоидов, прогрессирующую подвижность, нормальную и аномальную морфологию сперматозоидов [29]. С другой стороны, определение АСА нельзя исключать из комплексной оценки качества спермы, поэтому рекомендуется к использованию в качестве дополнительного теста в практике клинко-диагностической лаборатории (КДЛ) и как элемент стандартного лабораторного исследования в протоколе эмбриологической лаборатории.

К основным лабораторным методам определения АСА относятся проточная цитометрия (ПЦМ), иммуноферментный анализ (ИФА), латексная агглютинация (ЛА) образцов семенной плазмы, ЛА образцов подвижных сперматозоидов MarScreen® IgA, Anti-IgM, Anti-IgG (MAR-тест/Mixed agglutination reaction/смешанная антиглобулиновая реакция), АСА на сперматозоидах ImmunoSpheres® Anti-IgM, Anti-IgA, Anti-IgG, суммарные АСА на сперматозоидах ImmunoSpheres® Anti-Ig(H&L) и др. (табл. 1). На территории РФ предлагается неполный перечень коммерчески доступных наборов реагентов для определения АСА указанными методами. В настоящее время для клинической лабораторной диагностики разрешены только ИФА-наборы нескольких производителей и MAR-тест единственного производителя ввиду наличия регистрационных удостоверений (РУ) РФ. Все остальные перечисленные реагенты разрешены к использованию только в научных целях (информация актуальна на момент выхода публикации).

Таблица 1 / Table 1

Сравнительная характеристика методов определения АСА
Comparative characteristics of the ASA identification methods (anti-sperm antibodies)

Технологические характеристики метода Technological characteristics of the method	Метод / Method				
	ЛА Bioserv (снят с производства за рубежом, нет поставок в РФ) LA* Bioserv (discontinued, no deliveries to the Russian Federation)	MAR-тест (РУ РФ на реагенты у единственного производителя) MAR-test (only one manufacturer obtains registration certificate in Russia)	ЛА IMMUNOSPHERES® (нет РУ РФ на реагенты) LA IMMUNOSPHERES (no registration certificate in Russia)	ИФА (РУ РФ на реагенты есть) Enzyme immunoassay (Reagents with registration certificate are in Russia)	ПЦМ (нет РУ РФ на реагенты) FCM (no registration certificate in Russia)
Тип образца Sample type	Семенная плазма, цервикальная слизь, смыв из полости матки, сыворотка Seminal plasma, cervical mucus, wash-out from the uterine cavity, serum	Необработанная сперма. Сыворотка крови: непрямой метод Raw semen. Blood serum: indirect method	Отмытые сперматозоиды. Непрямой метод позволяет определять антитела в сыворотке крови Washed spermatozoa. The indirect method allows to determine antibodies in the blood serum	Сыворотка крови, семенная плазма Blood serum, seminal plasma	Отмытые сперматозоиды/биологическая жидкость Washed spermatozoa / biological fluid
Тип определяемых антител Antibody type	Суммарные антитела/антитела классов А, G, М Total antibodies/antibodies of classes A, G, M	Антитела классов А, G, М на сперматозоидах Antibodies of classes A, G, M on spermatozoa	Суммарные антитела/антитела классов А, G, М на сперматозоидах Total antibodies/antibodies of classes A, G, M on spermatozoa	Суммарные антитела/антитела классов А, G, М Total antibodies/antibodies of classes A, G, M	Суммарные антитела/антитела классов А, G, М Total antibodies/antibodies of classes A, G, M
Принцип метода Principle of method	Метод латексной агглютинации: определяются антитела против комплексного спермального антигена, фиксированного на латексных частицах Latex agglutination method: antibodies against a complex special antigen fixed on latex particles are determined	Метод латексной агглютинации: антиглобулиновая сыворотка связывается латексом, покрытым специфическими иммуноглобулинами, и с АСА (одного класса) на мембране подвижных сперматозоидов, образуя агглютинаты Latex agglutination method: antiglobulin serum binds with latex, covered with specific immunoglobulins, and with ASA (of the same class) on the membrane of motile spermatozoa, forming agglutinates	Метод латексной агглютинации: определяются антитела против антигенов мембраны подвижных сперматозоидов с помощью антител против иммуноглобулинов, фиксированных на латексных частицах Latex agglutination method: antibodies against antigens of the membrane of motile spermatozoa are determined using antibodies against immunoglobulins fixed on latex particles	Непрямой твердофазный иммуноферментный анализ Indirect solid-phase enzyme immunoassay	Определяются антитела против спермальных антигенов мембраны сперматозоидов с помощью флуоресцентно-меченых антител против иммуноглобулинов/спермального антигена, фиксированных на латексных частицах Antibodies against sperm antigens of the sperm membrane are determined using fluorescently labeled antibodies against immunoglobulins/sperm antigen fixed on latex particles
Считывание результатов Evaluating the results	Визуальное по латексной агглютинации в капле, полуколичественное определение (титрование) Visual by latex agglutination in a drop, semi-quantitative determination (titration)	По количеству сперматозоидов, несущих АСА. Световой или фазово-контрастный микроскоп по латексным агглютинатам с подвижными сперматозоидами By the number of spermatozoa carrying ASA. Light or phase-contrast microscope with latex agglutinate with motile spermatozoa	По количеству сперматозоидов, несущих АСА. Световой или фазово-контрастный микроскоп по латексным частицам на мембране сперматозоидов By the number of spermatozoa carrying ASA. Light or phase-contrast microscope for latex particles on the sperm membrane	Планшетный фотометр, количественное определение суммарных антител/качественное определение класса антител Flatbed photometer, quantitative determination of total antibodies/qualitative determination of the class of antibodies	Проточный цитометр, количественное определение – антител, связанных антигенами сперматозоидов/латексными частицами на мембране сперматозоидов Flow cytometer, quantitative determination of antibodies bound by sperm antigens/latex particles on the sperm membrane

Продолжение табл. 1 / Continuation of Table 1

Технологические характеристики метода Technological characteristics of the method	Метод / Method				
	ЛА Bioserv (снят с производства за рубежом, нет поставок в РФ) LA* Biosery (discontinued, no deliveries to the Russian Federation)	MAR-тест (РУ РФ на реагенты у единственного производителя) MAR-test (only one manufacturer obtains registration certificate in Russia)	ЛА IMMUNOSPHERES® (нет РУ РФ на реагенты) LA IMMUNOSPHERES (no registration certificate in Russia)	ИФА (РУ РФ на реагенты есть) Enzyme immunoassay (Reagents with registration certificate are in Russia)	ПЦМ (нет РУ РФ на реагенты) FCM (no registration certificate in Russia)
Время инкубации Incubation time	2 мин – суммарные антитела/1 ч – определение класса антител 2 min – total antibodies/1 hour – determination of the antibody class	2 мин – прямое определение антител в сперме/1 ч 30 мин – определение в сыворотке 2 min – direct determination of antibodies in semen/1 hour 30 min – determination in serum	2 мин – прямое определение антител на сперматозоидах/1 ч 30 мин – определение в сыворотке 2 min – direct determination of antibodies on spermatozoa/1 hour 30 min – determination in serum	2 ч 30 мин 2 hours and 30 minutes	2 мин – прямое определение антител на сперматозоидах/1 ч 30 мин – определение в сыворотке 2 min – direct determination of antibodies on spermatozoa/1 hour 30 min – determination in serum
Преимущества метода Method advantages	Высокая чувствительность, простота выполнения (визуальная оценка, быстрота), возможность определения при азооспермии, возможность определения у мужчин и женщин (в сыворотке и цервикальной слизи) High sensitivity, ease of execution (visual assessment, speed), the possibility of determination in azoospermia, the possibility of determination in men and women (in serum and cervical mucus)	Быстрота, возможность определить антигенную направленность антител (структуру сперматозоида, против которой направлены антитела – головка, шейка, хвост) Speed, the ability to determine the antigenic orientation of antibodies (the structure of the sperm against which the antibodies are directed – the head, neck, tail)	Более высокие чувствительность и специфичность по сравнению с MAR-тестом, возможность определить антигенную направленность антител (структуру сперматозоида, против которой направлены антитела – головка, шейка, хвост) Higher sensitivity and specificity compared to the MAR-test, the ability to determine the antigenic orientation of antibodies (the structure of the sperm against which the antibodies are directed – the head, neck, tail)	Высокие воспроизводимость, чувствительность и специфичность метода, возможность автоматического выполнения теста, возможность определения у мужчин и женщин High reproducibility, sensitivity and specificity of the method, the ability to automatically perform the test, the ability to determine in men and women	Высокие воспроизводимость и чувствительность, автоматическое выполнение теста, возможность определить концентрацию и антигенную направленность антител на мембране сперматозоидов High reproducibility and sensitivity, automatic test execution, the ability to determine the concentration and antigenic orientation of antibodies on the sperm membrane
Ограничения метода Method limitations	Невозможно определить антигенную направленность антител (структуру сперматозоида, против которой направлены антитела) It is impossible to determine the antigenic orientation of the antibodies (the structure of the sperm against which the antibodies are directed)	Непригоден для образцов с азооспермией. Ограничение по общему количеству и количеству подвижных сперматозоидов: для прямого теста необходимо не менее 10 млн/мл сперматозоидов Unsuitable for samples with azoospermia. Restriction on the total number and number of motile spermatozoa: for a direct test, at least 10 million/ml of spermatozoa are required	Непригоден для образцов с азооспермией. Ограничение по количеству подвижных сперматозоидов: необходимо не менее 5 млн/мл для прямого теста и не менее 50 млн/мл для непрямого теста. Дополнительный этап: отмывка сперматозоидов Unsuitable for samples with azoospermia. Restriction on the number of motile spermatozoa: at least 5 million/ml is required for a direct test and at least 50 million/ml for an indirect test. Additional step: washing of spermatozoa	Невозможно определить антигенную направленность антител (структуру сперматозоида, против которой направлены антитела) It is impossible to determine the antigenic orientation of the antibodies (the structure of the sperm against which the antibodies are directed)	Необходимо сложное и дорогостоящее оборудование – проточный цитометр. Дополнительный этап: отмывка сперматозоидов Complex and expensive equipment is needed – a flow cytometer. Additional step: washing of spermatozoa

*LA – latex agglutination.

Для повышения диагностической точности рекомендуется комбинация методов определения как в месте образования АСА (сперма, фолликулярная жидкость), так и в сыворотке. Применение MAR-теста в виде единственного диагностического подхода к выявлению АСА не рекомендуется в связи с ограничениями: 1) в MAR-тесте учет результатов происходит по подвижным сперматозоидам, поэтому при астенозооспермии и некрозооспермии проведение анализа нецелесообразно, а при азооспермии – невозможно; 2) метод трудоемкий, при малом потоке удобнее латексный метод, но реагенты для него сняты с производства за рубежом, а отечественных аналогов не существует. В текущей ситуации для определения АСА рекомендовано использовать сочетание MAR-тест и ИФА. Самостоятельный ИФА с определением класса иммуноглобулинов IgG, IgA, IgM также имеет ограниченное использование: чаще используют IgG, реже IgA, а выявление IgM используется в основном только для научных исследований.

Пероксидаза-положительные клетки (ППК) (или нейтрофильные лейкоциты или гранулоциты) в эякуляте могут появляться из любого отдела МДПЖ – семявыносящих путей, включая придаток яичка, предстательной железы, семенных пузырьков и уретры; в норме составляют 50 – 80 % всех лейкоцитов. Обнаружение ППК в эякуляте имеет важное диагностическое значение [30, 31].

Повышенное содержание ППК в семенной жидкости определяется как лейкоцитоспермия или пиоспермия. Крайне важно не допускать ложную пиоспермию, так как необоснованно назначенное антибактериальное лечение может необратимо спровоцировать патологию остальных главных показателей эякулята. ППК можно отличить от других круглых клеток (КК) эякулята с использованием специфической окраски на фермент пероксидазу. ППК в семенной жидкости определены Всемирной Организацией Здравоохранения (ВОЗ) основным параметром для оценки

воспалительного процесса при анализе эякулята человека [31].

До 2021 года в России определение ППК в сперме не было стандартизовано ввиду отсутствия набора реагентов, позволяющего провести цитохимическое окрашивание нейтрофильных лейкоцитов; так же отсутствовал протокол окрашивания и подсчета концентрации ППК, адаптированный к российским КДЛ. В этой связи обнаружение нейтрофильных гранулоцитов являлось одной из проблемных аналитов спермограммы, неверная оценка которых приводила к разночтению результатов и недостоверной диагностике.

В 2019 году совместно с научно-исследовательской лабораторией клинических разработок Международной Школы Цитологии и Медицинской Школы Инноваций (Москва) (далее Школа) и КДЛ сети медицинских клиник г. Подольска (Московская область) был проведен анализ эякулята от 200 мужчин. Исследование указало на главный источник ошибок в подсчете ППК.

Идентификация ППК проводилась двумя способами: 1) *способом 1*, где за основу подсчета гранулоцитов была принята известная методика оценки содержания круглых клеток (КК) без цитохимического окрашивания – ППК оценивались по косвенным идентификационным признакам (округлой форме, сегментированным ядрам, микроворсинчатой поверхности, среднему размеру), что не соответствует рекомендациям ВОЗ; 2) *способом 2*, компонентами набора реагентов для окраски и комплексной оценки эякулята человека – ГЕМСТАНДАРТ-СПЕРМОГРАММА©2 726207 (С-Петербург, Россия, № РЗН 2021/13931 от 06.04.2021, научная идеология принадлежит Школе) (далее Набор) [32 – 35].

Способ 1: происходила ошибочная интерпретация и излишний подсчет концентрации бесцветных (неокрашенных) лейкоцитов: за ППК были приняты все КК, не содержащие пероксидазу. Все КК были отнесены к лейкоцитам по их субъективным признакам, что привело к ложной пиоспермии.

Таблица 2 / Table 2

Результаты установленной пиоспермии двумя способами
The results of the established pyospermia by two techniques

Оценка ППК, $n = 200$, пациенты <i>PPL evaluation, $n = 200$, patients</i>	Способ 1, результат, n , пациенты <i>Technique 1, result, n, patients</i>	Способ 2, результат, n , пациенты <i>Technique 2, result, n, patients</i>
Пиоспермия (концентрация ППК $> 1 \times 10^6$ /мл) <i>Pyospermia (PPL concentration $> 1 \times 10^6$/ml)</i>	96	55

Принцип действия реагентов Набора для цитохимического окрашивания ППК (способ 2):

- окрашивают в коричневый цвет клетки, содержащие пероксидазу (нейтрофильные лейкоциты);
- клетки, не содержащие пероксидазу (сперматозоиды, клетки сперматогенеза, лимфоциты, моноциты, макрофаги, спермиофаги, гистиоциты, эритроциты, липоидные тельца, эпителий), остаются бесцветными.

Очевидно, что Способ 1 не приемлем для первичной идентификации и подсчета концентрации нейтрофильных лейкоцитов в сперме, так как не дает представления об истинном содержании ППК.

До начала 2021 года, в соответствии с различными вариациями протоколов спермограммы и отсутствием унифицированного подхода, широкое применение в практике КДЛ находила методика оценки присутствия лейкоцитов в эякуляте на тест-полоске с помощью иммунохроматографического

метода, основанного на ферментативной активности лейкоцитарной эстеразы. Недостатки методики заключались в следующем: 1) приблизительно определяет присутствие лейкоцитов, но не ППК в эякуляте; 2) риск установления ложной пиоспермии, так как лейкоцитарная эстераза появляется в биожидкости и при разрушении лейкоцитов; 3) не дает истинного представления о наличии или отсутствии воспалительного процесса в МДПЖ; 4) не входит в протоколы руководства ВОЗ (не рекомендовано для оценки ППК).

Инфекционно-воспалительное заболевание МДПЖ признано считать одной из частых причин нарушений фертильности мужчин с распространенностью от 6,6 до 50 % [36, 37]. Понимание важности правильной оценки воспалительного компонента эякулята диктует необходимость использования Набора в практике КДЛ и эмбриологической лаборатории.

Рис. 1. ППК/нейтрофильные лейкоциты (I), окрашенные в коричневый цвет;

КК (2) – неокрашенные (бесцветные). Нативный препарат, приготовленный Способом 2. ×400

Fig. 1. PPL/neutrophil leukocytes (I) – brown colour; unpainted (colorless) – (2). Native slide, made by Technique 2. ×400

Появление в лабораторном реестре первого Набора с РУ РФ обязывает каждую без исключения КДЛ РФ иметь в арсенале реагентов новое средство для оценки параметров спермограммы. Несмотря на то, что высокопоточные медицинские лаборатории используют для оценки эякулята анализаторы спермы, компьютерные технологии анализа спермы человека (CASA/computer assisted sperm analyses), искусственный интеллект и комбинацию методов на его основе, перечисленные высокотехнологичные методы не могут обеспечить проведение двух важных процедур спермограммы: разжижить вязкий эякулят, окрасить и оценить концентрацию истинных ППК.

Семь реагентов в составе Набора – это семь основных функций: 1) разжижение вязкого эякулята, 2) цитохимическое окрашивание и 3) определение концентрации ППК, 4) определение концентрации сперматозоидов; 5) цитохимическое окрашивание живых и 6) мертвых сперматозоидов; 7) цитохимическое окрашивание сперматозоидов для оценки их морфологии. Все процессы сопровождаются формулами расчета, адаптированными под российские условия. С помощью Набора с 99,9 % точностью решается вопрос о состоянии сперматогенеза, наличии воспаления в МДПЖ, исключаются ошибки аналитического этапа оценки фертильности и мониторинга сперматогенеза в 2,2 раза по сравнению с прежней устаревшей технологией.

К преимуществам Набора относятся: 1) выявление диагностически важных клеток, не содержащих пероксидазу: макрофаги/гистиоциты, спермиофаги, эпителий, эритроциты, липоидные тельца и др.; 2) комбинированная оценка концентрации ППК и сперматозоидов «в одной пробирке за одну процедуру» по типу методики ROSE (rapid onsite examination); 3) подробное методическое сопровождение и стандартизация аналитического этапа спермограммы; 4) оптимизация аналитического этапа спермограммы и повышение безопасности медицинского персонала при работе с реагентами – на 300 % снижена трудоемкость производства рутинной спермограммы, что увеличивает ТАТ/turnaround time (время оборота теста) в лаборатории и способствует повышению пропускной способности анализа эякулята в 3 раза; 5) кардинально улучшены социальные условия исполнения спермограммы путем внедрения в практику Набора реагентов, который не содержит мутагенных, канцерогенных химических веществ, влияющих на репродуктивную деятельность человека и представляющих опасность для персонала КДЛ.

В настоящее время библиотеку урологов-андрологов продолжает пополнять литература, позиционируемая в качестве клинических рекомендаций, но не утвержденная Министерством здравоохранения РФ [38]. Согласно этим источникам, широко представленным в Рунете, для обследования мужчин, страдающих бесплодием и(или) проходящих прегравидарную подготовку, необходимо исследовать секрет предстательной железы (СПЖ) или постмассажную порцию мочи. Во многих случаях мужчины отказываются от массажа предстательной железы ввиду особенностей взятия этих биологических образцов, поэтому остаются недообследованными. Более того, ключевую роль в недостоверной диагностике СПЖ любыми лабораторными методами играют: инвазивная процедура отбора образцов (болезненность, некомфортное ощущение во время взятия, потеря материала на этапе отбора пробы и др.); отсутствие унифицированных подходов к правилам взятия СПЖ для микроскопического анализа, который входит в СПМП при некоторых нозологиях в урологии мужского пола (нет единых требований к контейнерам для взятия и транспортировки СПЖ: размещать образец на предметное стекло или в микропробирку?); отсутствие стандартизации аналитического лабораторного этапа – не определены требования к формату диагностики: исследовать нативный и(или) окрашенный образец? В настоящее время не существует федеральных и локальных стандартных операционных процедур (СОП) для микроскопической диагностики СПЖ, что негативно отражается на последующей лечебной тактике, вовлекая в процесс назначений череду клинически и экономически неоправданных дополнительных медицинских услуг.

Многолетняя российская клиническая и лабораторная практика, результативно освещенная в российских и зарубежных публикациях, показывает готовность пациентов собрать образец эякулята вместо инвазивного взятия СПЖ. Ввиду того, что сперма представляет собой комплексный продукт из содержимого МДПЖ, лечащий врач видит достоверное лабораторное подтверждение состояния всех необходимых для диагностики локаций урогенитального тракта мужчины. К тому же при сборе эякулята исключаются многие преаналитические внелабораторные ошибки на этапе подготовки пациента к исследованию, которые, как правило, не соблюдаются при взятии мазка из уретры.

Важным биоматериалом для установления причины бесплодия супружеской пары является **осадок эякулята**, который представляет собой свободный от спермоплазмы концентрированный клеточный материал, идеально подходящий для поиска ценных диагностических находок различными лабораторными методами: цитологическим VisionCyto® SpermSediment (ЦОЭ/цитологическое исследование осадка эякулята) – для качественной оценки клеточного и микробного состава; МАНК/ПЦР-РВ (метод амплификации нуклеиновых кислот/полимеразно-цепная реакция в режиме реального времени) – для оценки микробиоценоза (тест-система «Андрофлор», ДНК-технологии, Россия) и ВПЧ ВКР-статуса (вирус папилломы человека высокого канцерогенного риска), тест-системы «Амплисенс», ИнтерЛабСервис, Россия), а также микробиологическим исследованием осадка эякулята на аэробные и анаэробные патогены [39 – 43].

Исследования, проведенные более чем на 5000 образцах осадка эякулята, свидетельствуют, что метод ЦОЭ зарекомендовал себя как неинвазивная, быстрая (до 1 р/д) лабораторная технология для своевременного и полного представления о клеточном, в том числе воспалительном, а также бактериальном и вирусном компоненте МДПЖ для последующего выбора верного диагностического и лечебного менеджмента. С помощью ЦОЭ можно обнаружить *Trichomonas vaginalis*, *Gardnerella vaginalis*, *Candida*. Кроме того, опытный цитолог идентифицирует клетки, ассоциированные с вирусом папилломы человека высокого канцерогенного риска (ВПЧ ВКР) (койлоцитами), с цитомегаловирусом (ЦМВ) (клетками типа «совиный глаз»), эпителиальными включениями, морфологически сходными с *Chlamydia trachomatis*, многоядерными клетками, пораженными *Herpes simplex*, клетками хронического воспаления типа инородных тел (гигантскими гистиоцитами/макрофагами); также указывает на наличие дегенеративных изменений в плоском, железистом эпителии и уротелии в случае его десквамации при воспалительных и других процессах, что служит важной диагностической информацией для лечащего врача для понимания стадии патологического процесса. ЦОЭ может быть рекомендована для однопрофильного скрининга групп лиц мужской популяции с хроническими заболеваниями урогенитального тракта или с начальными их признаками в целях первичного отбора лиц, требующих консультации узких спе-

циалистов, оптимизации выбора тактики дообследования, формирования групп повышенного риска.

В диагностические возможности ЦОЭ входит не только выявление инфекционных возбудителей, но также, возможно, предраковых и раковых клеток, имеющих происхождение как из МДПЖ, так и из мочевого пузыря и даже почек. Для тестирования этой гипотезы требуются рандомизированные клинические исследования для установления диагностической информативности ЦОЭ в скрининге рака у мужчин [34, 39 – 42].

Акрсомальный белок и фермент акрозин являются дополнительными маркерами, определяющими способность сперматозоидов к оплодотворению. Анализ эякулята для установления целостности акросом проводят на проточном цитофлуориметре (как пример, линейки Navios, Beckman Coulter (США), анализатор имеет РУ РФ – информация актуальна на момент выхода публикации), что позволяет детектировать клетки по специфическому окрашиванию [44]. Образцы эякулята инкубируют с антителами к внутриакросомальному белку и оценивают его наличие на поверхности путем окрашивания соответствующим набором реагентов (как пример, SpermFlow Kit, ExBio (Чехия), РУ РФ отсутствует, набор реагентов доступен только для научных исследований (информация актуальна на момент выхода публикации)).

Известно, что **антиоксидантная система человека (АОС)** блокирует образование высокоактивных свободных радикалов. В норме семенная плазма содержит множество энзимных и неэнзимных антиоксидантов (супероксиддисмутазы (SOD), каталазы). Массив антиоксидантов, действующих в качестве акцепторов активных форм кислорода (АФК), защищает сперму от окислительного повреждения. Выявлено снижение активности SOD при олигоастенозооспермии, по сравнению с нормозооспермией. Методом электронной микроскопии показана значительная корреляция между концентрацией карбонилированных белков и степенью выраженности нарушений структуры сперматозоидов при идиопатической олигоастенотератозооспермии. Показана обратная корреляция между подвижностью сперматозоидов и уровнем перекисного окисления липидов. В сочетании с фактом наличия прямой корреляции уровня АОС с подвижностью сперматозоидов подтверждается, что более высокие концентрации антиоксидантов предотвращают перекисное окисление липидной мембраны

сперматозоидов, тем самым обеспечивая их большую подвижность.

При тестировании АОС в образцах крови мужчин с различными формами нарушения сперматогенеза каких-либо значительных отклонений от нормы не выявляется, однако уровни АОС в образцах семенной плазмы достоверно снижены в группах с олигастенозооспермией II и III степени по сравнению с контрольной группой пациентов с нормозооспермией и группой пациентов с астенозооспермией. Общую антиоксидантную способность можно измерить на портативном анализаторе FORM Plus, Callegari SpA. (имеет РУ РФ, информация актуальна на момент выхода публикации), позволяющем выполнять количественные экспресс-определения в образцах цельной крови, сыворотки, плазмы, семенной плазмы (тест FORD). По данным мировой литературы, окислительное повреждение сперматозоидов, в том числе ДНК-фрагментация, обусловленное повышением уровня АФК в эякуляте, может иметь место даже при концентрации ППК меньше $10^6/L$ [45, 46].

Представляется уместным упомянуть тонкоигльную аспирационную биопсию (ТАБ) яичек – инвазивную процедуру для получения аспирата в целях последующего цитологического исследования клеточного материала тестикул. Лабораторный диагноз «азооспермия», подтвержденный дважды методом спермограммы, требует дообследования мужчины с последующим проведением ТАБ семенников для качественной и количественной характеристики сперматогенеза. В таких случаях ТАБ может служить ценной вспомогательной методикой для исключения/подтверждения диагноза. Согласно результатам последних исследований индийских ученых [47], ТАБ тестикул можно назвать «золотым стандартом» для диагностики обструктивной и необструктивной азооспермии. Исследователи рекомендуют проводить двухстороннюю мультифокальную аспирацию, которая, по их мнению, будет в полной мере отражать точную морфологическую структуру яичка, в отличие от однофокальной аспирации, результаты цитологического исследования которой могут быть недостаточно репрезентативны. Адекватность полученных образцов определялась путем подсчета не менее 2000 клеток в аспирате. Различные популяции клеток и их процентное соотношение идентифицировали с помощью морфологических критериев Schenck и Schill [48], Papic et al. [49] и Foresta et al. [50]. Для классификации азооспермии использовались три клеточных индекса: (1) индекс сперматозоидов (ИС) – количество зрелых сперматозоидов/100 сперматогенных клеток;

(2) индекс Сертоли/Сертоли-клеточный индекс (СКИ) – количество КС/100 сперматогенных клеток; (3) индекс сперматозоидов-Сертоли (ИСС) – отношение зрелых сперматозоидов к клеткам Сертоли. Было установлено, что ИС был значительно выше во всех случаях нормального сперматогенеза, чем в любом из случаев гипосперматогенеза ($p = 0,009$); СКИ в случаях гипосперматогенеза и остановки созревания был значительно выше, чем при нормальном сперматогенезе ($p < 0,001$); ИСС также показал значительные различия между случаями гипосперматогенеза и нормального сперматогенеза ($p < 0,001$). Эти индексы были полезны при классификации пациентов с различной морфологической картиной азооспермии. Было установлено, что ТАБ яичек может адекватно передать состояние сперматогенеза в семенниках и предоставить врачу полную информацию для выбора дальнейшей стратегии лечения. Ценность результатов цитологического исследования аспирата семенников в подтверждении/отрицании присутствия даже единичных элементов эякулята в яичках, поскольку достижения в области репродуктивной медицины позволяют надеяться на один единственный сперматозоид, который может дать шанс мужчинам с необструктивной формой азооспермии насладиться биологическим отцовством.

Заключение

Обобщение лучшего мирового опыта профессионалов и стремление к инновационной лабораторной диагностике обуславливает необходимость пересмотра федеральных НПА и написания их в новой редакции в тесном междисциплинарном взаимодействии со специалистами лабораторной медицины.

Продуманная и безопасная междисциплинарная концепция оценки анализа эякулята и осадка спермы грамотно подобранным алгоритмом из методов откроет другие горизонты и перспективы, которые позволят специалистам лабораторной и клинической медицины в короткие сроки провести безошибочную дифференциальную диагностику и лечение пациентов с определенными сценариями патоспермии, чье «окно фертильности» не должно быть временным.

Список литературы

1. Hedger M.P. The immunophysiology of male reproduction. In: Knobil and Neill's Physiology of Reproduction. Elsevier. 2015. P. 805–892. DOI 10.1016/b978-0-12-397175-3.00019-3

2. Monika F., Sudhanshu B. and Meinhardt A. A. *Immune Infertility-The Immune Privilege of the Testis*. Berlin: Springer. 2017.
3. Mellor A.L. and Munn D.H. (2006). Immune privilege: a recurrent theme in immunoregulation? // *Immunological Reviews*. 2006. Vol. 213, P. 5–11. DOI 10.1111/j.1600-065x.2006.00443.x
4. Hedger MP. Immunophysiology and pathology of inflammation in the testis and epididymis // *Journal of Andrology*. 2011. Vol. 32, N6. P. 625-640. DOI:10.2164/JANDROL.111.012989
5. Fijak M., Pilatz A., Hedger M.P., et al. Infectious, inflammatory and 'autoimmune' male factor infertility: how do rodent models inform clinical practice? // *Hum Reprod Update*. 2018. Vol. 24. No. 4. P. 416-441. DOI 10.1093/humupd/dmy009
6. Philip J., Selvan D., Desmond A.D. Mumps orchitis in the non-immune postpubertal male: a resurgent threat to male fertility? // *BJU International*. 2006. Vol. 97, N1. P.138-141. DOI 10.1111/j.1464-410X.2006.05902.x
7. Garolla A., Pizzol D., Bertoldo A., et al. Sperm viral infection and male infertility: focus on HBV, HCV, HIV, HPV, HSV, HCMV, and AAV // *Journal of Reproductive Immunology*. 2013. Vol. 100, N.1. P. 20-29. DOI 10.1016/j.jri.2013.03.004
8. Fallarino F., Luca G., Calvitti M., et al. Therapy of experimental type 1 diabetes by isolated Sertoli cell xenografts alone // *The Journal of Experimental Medicine*. 2009. Vol. 206, N11. P. 2511-2526. DOI 10.1084/jem.20090134
9. Zhao S., Zhu W., Xue S., Han D. Testicular defense systems: immune privilege and innate immunity // *Cellular & Molecular Immunology*. 2014. Vol. 11, N5. P. 428-437. DOI 10.1038/cmi.2014.38
10. De S.K., Chen H.L., Pace J.L., et al. Expression of tumor necrosis factor-alpha in mouse spermatogenic cells // *Endocrinology*. 1993. Vol. 133, N1. P. 389-396
11. Avallet O., Vigier M., Leduque P., et al. Expression and regulation of transforming growth factor-beta1 messenger ribonucleic acid and protein in cultured porcine Leydig and Sertoli cells // *Endocrinology*. 1994. Vol. 134, N5. P. 2079-2087. DOI 10.1210/endo.134.5.8156908
12. Meehan T., Schlatt S., O'Bryan M.K., et al. Regulation of germ cell and Sertoli cell development by activin, follistatin, and FSH // *Developmental Biology*. 2000. Vol. 220, N2. P. 225-237. DOI 10.1006/dbio.2000.9625
13. Gerdprasert O., O'Bryan M.K., Muir J.A., et al. The response of testicular leukocytes to lipopolysaccharide-induced inflammation: further evidence for heterogeneity of the testicular macrophage population // *Cell and Tissue Research*. 2002. Vol. 308, N2. P. 277-285. DOI 10.1007/s00441-002-0547-6
14. Bhushan S., Tchatalbachev S., Lu Y., et al. Differential activation of inflammatory pathways in testicular macrophages provides a rationale for their subdued inflammatory capacity // *The Journal of Immunology*. 2015. Vol. 194, N11. P. 5455-5464. DOI 10.4049/jimmunol.1401132
15. Mantovani A., Sica A., Sozzani S., et al. The chemokine system in diverse forms of macrophage activation and polarization // *Trends in Immunology*. 2004. Vol. 25, N12. P. 677-686. DOI 10.1016/j.it.2004.09.015
16. Biswas S.K., Mantovani A. Macrophage plasticity and interaction with lymphocyte subsets: cancer as a paradigm // *Nature Immunology*. 2010. Vol. 11, N10. P. 889-896. DOI 10.1038/ni.1937
17. Geissmann F., Manz M.G., Jung S., et al. Development of monocytes, macrophages, and dendritic cells // *Science*. 2010. Vol. 327, N5966. P. 656-661. DOI 10.1126/science.1178331
18. Locati M., Mantovani A., Sica A. Macrophage activation and polarization as an adaptive component of innate immunity // *Advances in Immunology*. 2013. Vol. 120, P. 163-184. DOI 10.1016/B978-0-12-417028-5.00006-5
19. Murray P.J., Allen J.E., Biswas SK, et al. Macrophage activation and polarization: nomenclature and experimental guidelines // *Immunity*. 2014. Vol. 41, N1. P. 14-20. DOI 10.1016/j.immuni.2014.06.008
20. Li Y., Su Y., Zhou T., et al. Activation of the NLRP3 Inflammasome Pathway by Prokineticin 2 in Testicular Macrophages of Uropathogenic *Escherichia coli*-Induced Orchitis // *Frontiers in Immunology*. 2009. Vol. 10, P. 1-13. DOI 10.3389/fimmu.2019.01872
21. Rival C., Lustig L., Iosub R., et al. Identification of a dendritic cell population in normal testis and in chronically inflamed testis of rats with autoimmune orchitis. 2006. Vol. 324, N2. P. 311-318. DOI 10.1007/s00441-005-0129-5
22. Jacobo P., Guazzone V.A., Jarazo-Dietrich S., et al. Differential changes in CD4+ and CD8+ effector and regulatory T lymphocyte subsets in the testis of rats under-going autoimmune orchitis // *Journal of Reproductive Immunology*. 2009. Vol. 81, N1. P. 44-54. DOI 10.1016/j.jri.2009.04.005
23. Hedger M.P., Meinhardt A. Local regulation of T cell numbers and lymphocyte-inhibiting activity in the interstitial tissue of the adult rat testis // *Journal of Reproductive Immunology*. 2000. Vol. 48, N.2. P. 69-80. DOI 10.1016/S0165-0378(00)00071-1
24. De Rose R., Fernandez C.S., Hedger M.P., et al. Characterisation of macaque testicular leucocyte populations and T-lymphocyte immunity // *Journal of Reproductive Immunology*. 2013. Vol. 100, N2. P. 146-156. DOI 10.1016/j.jri.2013.09.003
25. Loveland K.L., Klein B., Poeschl D., et al. Cytokines in Male Fertility and Reproductive Pathologies: Immunoregulation and Beyond // *Frontiers in Endocrinology*. 2017. Vol. 8, P. 307. DOI 10.3389/fendo.2017.0030
26. Tüttelmann F., Nieschlag E. *Nosologie andrologischer Krankheitsbilder*. In: Nieschlag E., Behre H.M., Nieschlag S. (eds.): *Andrologie – Grundlagen und Klinik der reproduktiven Gesundheit des Mannes*. 3rd edition. Heidelberg: Springer; 2009; P. 90–96
27. Mazumdar S., Levine A.S. Antisperm antibodies: etiology, pathogenesis, diagnosis, and treatment // *Fertility and Sterility*. 1998. Vol. 70, N5. P. 799-810. DOI 10.1016/S0015-0282(98)00302-1
28. Chamley L.W., Clarke G.N. Antisperm antibodies and conception // *Seminars in Immunopathology*. 2007. Vol. 29, N2. P. 169-184. DOI 10.1007/s00281-007-0075-2
29. Verón G.L., Molina R.I., Tissera A.D., et al. Incidence of Sperm Surface Autoantibodies and Relationship with Routine Semen Parameters and Sperm Kinematics // *American Journal of Reproductive Immunology*. 2016. Vol. 76, N1. P. 59-69. DOI 10.1111/aji.12519

30. Weidner W., Pilatz A., Diemer T., et al. Male uro-genital infections: impact of infection and inflammation on ejaculate parameters // *World J Urol.* 2013. Vol. 31, N4. P. 717-723. DOI 10.1007/s00345-013-1082-7
31. WHO laboratory manual for the examination and processing of human semen. 5th edn. Geneva, 2010. 287 p. Available at: http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/44261/1/9789241547789_eng.pdf
32. Сапожкова Ж.Ю., Еремин К.И. Модификация аналитического этапа спермограммы // *Клиническая лабораторная диагностика.* 2020. Т. 65, № 2. С. 106-110. DOI 10.18821/0869-2084-2020-65-2-106-110
33. Сапожкова Ж.Ю., Еремин К.И. Долгов В.В. Унификация процедур цитохимического окрашивания эякулята для определения фертильности мужчины // *Лабораторная диагностика. Восточная Европа.* 2020. Т. 9, № 1–2. С. 41-49. DOI 10.34883/PL.2020.9.1.026
34. Сапожкова Ж.Ю. Способ микроскопической диагностики качества спермы после седиментации эякулята: Патент на интеллектуальную собственность, 2019. © 2 686685. URL <http://new.fips.ru>
35. Сапожкова Ж.Ю., Еремин К.И. Способ комбинированного измерения концентрации пероксидазоположительных клеток (нейтрофильных гранулоцитов) и сперматозоидов в эякуляте человека с использованием вариаций на основе цитохимического окрашивания: Патент на интеллектуальную собственность, 2020. © 2 726207. URL <http://new.fips.ru>
36. Weidner W., Wagenlehner FM, Marconi M, Pilatz A, Pantke KH, Diemer T. Acute bacterial prostatitis and chronic prostatitis/chronic pelvic pain syndrome: andrological implications // *Andrologia.* 2008. Vol. 40, N2. P. 105-112. DOI 10.1007/s00345-013-1082-7
37. Schuppe HC, Pilatz A, Hossain H, Diemer T, Wagenlehner F, Weidner W. Urogenital Infection as a Risk Factor for Male Infertility // *Deutsches Ärzteblatt International.* 2017. Vol. 114, N19. P. 339-346. DOI: 10.3238/arztebl.2017.0339
38. Клинические рекомендации по андрологической урологии / под ред. П.А. Щеплева. М.: Медфорум, 2016. 120 с.
39. Сапожкова Ж.Ю., VisionCyto® SpermSediment: Новые диагностические возможности цитологического исследования осадка эякулята // *Лаборатория. М.: Лабдиаг.* 2016. № 1. С. 46.
40. Сапожкова Ж.Ю., Шабалова И.П., Касоян К.Т. Исследование осадка эякулята в диагностике инфекций, передаваемых половым путем: учебное пособие. М.: ФГБОУ ДПО РМАНПО МЗ РФ; 2017.
41. Сапожкова Ж.Ю., Маколин И.А. ОАО «Медицина», Шаталов Ю.Н. НПЦЭМП ДЗМ Вопросы диагностики урогенитальных инфекций у мужчин // *Актуальные вопросы медицинской практики: сборник научных трудов.* 2018. С. 58–61.
42. Sapozhkova Z., Kasoyan K., Kovalchuk E., Shabalova I. Sperm Sediment Cytology: A New Technique for Diagnosing Occult Urologic Infections // *Acta Cytologica.* 2017. Vol. 61, N3. P. 247-251. DOI 10.1159/000469653
43. Pochernikov D.G., Postovoytenko N.T., Strelnikov A.I. Comparative analysis of cell culture and molecular genetic testing of semen microbiota in male infertility // *Andrologiya i genital'naya khirurgiya = Andrology and Genital Surgery.* 2019. Vol. 20, N2. P. 40–7. DOI 10.17650/2070-9781-2019-20-2-40-47
44. Gillan L., Evans G., Maxwell W.M.. Flow cytometric evaluation of sperm parameters in relation to fertility potential // *Theriogenology.* 2005. Vol. 63, N2. P. 445-457. DOI 10.1016/j.theriogenology.2004.09.024
45. Henkel R., Kierspel E., Stalf T., et al. Effect of reactive oxygen species produced by spermatozoa and leukocytes on sperm functions in non-leukocytospermic patients // *Fertility and Sterility.* 2005. Vol. 83, N3. P. 635-642. DOI 10.1016/j.fertnstert.2004.11.022
46. Erenpreiss J., Hlevicka S., Zalkalns J., Erenpreisa J. Effect of leukocytospermia on sperm DNA integrity: a negative effect in abnormal semen samples // *Journal of Andrology.* 2002. Vol. 23, N5. P. 717-723.
47. Jashnani K., Gundawar R., Kavishwar V., Parameshwar V. Fine-Needle Aspiration Cytology of the Testes for the Classification of Azoospermia and Its Value in the Assessment of Male Infertility // *Acta Cytologica.* 2020. Vol. 64, N3. P. 216-223. DOI 10.1159/000502790
48. Schenck U., Schill W.B. Cytology of the human seminiferous epithelium // *Acta Cytologica.* 1988. Vol. 32, N5. P. 689-696.
49. Papić Z., Katona G., Skrabalo Z. The cytologic identification and quantification of testicular cell subtypes. Reproducibility and relation to histologic findings in the diagnosis of male infertility // *Acta Cytologica.* 1988. Vol. 32, N5. P. 697-706
50. Foresta C., Varotto A., Scandellari C. Assessment of testicular cytology by fine needle aspiration as a diagnostic parameter in the evaluation of the azoospermic subject // *Fertility and Sterility.* 1992. Vol. 57, N4. P. 858-865.

References

1. Hedger MP. (2015). The immunophysiology of male reproduction. *Knobil Neill's Physiol. Reprod.* 2015, 805–892. DOI 10.1016/b978-0-12-397175-3.00019-3
2. Monika F, Sudhanshu B, and Meinhardt AA (2017). Immune Infertility-The Immune Privilege of the Testis. Berlin: Springer.
3. Mellor AL, and Munn DH (2006). Immune privilege: a recurrent theme in immunoregulation? *Immunol. Rev.* 213, 5–11. DOI 10.1111/j.1600-065x.2006.00443.x
4. Hedger MP. Immunophysiology and pathology of inflammation in the testis and epididymis. *J Androl.* 2011;32(6):625-640. doi:10.2164/jandrol.111.012989. DOI 10.1016/b978-0-12-397175-3.00019-3
5. Fijak M, Pilatz A, Hedger MP, et al. Infectious, inflammatory and 'autoimmune' male factor infertility: how do rodent models inform clinical practice?. *Hum Reprod Update.* 2018;24(4):416-441. DOI 10.1093/humupd/dmy00

6. Philip J, Selvan D, Desmond AD. Mumps orchitis in the non-immune postpubertal male: a resurgent threat to male fertility?. *BJU Int.* 2006;97(1):138-141. DOI 10.1111/j.1464-410X.2006.05902.x
7. Garolla A, Pizzol D, Bertoldo A, et al. Sperm viral infection and male infertility: focus on HBV, HCV, HIV, HPV, HSV, HCMV, and AAV. *J Reprod Immunol.* 2013;100(1):20-29. DOI 10.1016/j.jri.2013.03.004
8. Fallarino F, Luca G, Calvitti M, et al. Therapy of experimental type 1 diabetes by isolated Sertoli cell xenografts alone. *J Exp Med.* 2009;206(11):2511-2526. DOI 10.1084/jem.20090134
9. Zhao S, Zhu W, Xue S, Han D. Testicular defense systems: immune privilege and innate immunity. *Cell Mol Immunol.* 2014;11(5):428-437. DOI 10.1038/cmi.2014.38
10. De SK, Chen HL, Pace JL, et al. Expression of tumor necrosis factor-alpha in mouse spermatogenic cells. *Endocrinology.* 1993;133(1):389-396. DOI 10.1210/endo.133.1.8319585
11. Avallet O, Vigier M, Leduque P, et al. Expression and regulation of transforming growth factor-beta 1 messenger ribonucleic acid and protein in cultured porcine Leydig and Sertoli cells. *Endocrinology.* 1994;134(5):2079-2087. DOI 10.1210/endo.134.5.8156908
12. Meehan T, Schlatt S, O'Bryan MK, et al. Regulation of germ cell and Sertoli cell development by activin, follistatin, and FSH. *Dev Biol.* 2000;220(2):225-237. DOI 10.1006/dbio.2000.9625
13. Gerdprasert O, O'Bryan MK, Muir JA, et al. The response of testicular leukocytes to lipopolysaccharide-induced inflammation: further evidence for heterogeneity of the testicular macrophage population. *Cell Tissue Res.* 2002;308(2):277-285. DOI 10.1007/s00441-002-0547-6
14. Bhushan S, Tchatalbachev S, Lu Y, et al. Differential activation of inflammatory pathways in testicular macrophages provides a rationale for their subdued inflammatory capacity. *J Immunol.* 2015;194(11):5455-5464. DOI 10.4049/jimmunol.1401132
15. Mantovani A, Sica A, Sozzani S, et al. The chemokine system in diverse forms of macrophage activation and polarization. *Trends Immunol.* 2004;25(12):677-686. DOI 10.1016/j.it.2004.09.015
16. Biswas SK, Mantovani A. Macrophage plasticity and interaction with lymphocyte subsets: cancer as a paradigm. *Nat Immunol.* 2010;11(10):889-896. DOI 10.1038/ni.1937
17. Geissmann F, Manz MG, Jung S, et al. Development of monocytes, macrophages, and dendritic cells [published correction appears in *Science*. 2010 Dec 3;330(6009):1319]. *Science.* 2010;327(5966):656-661. DOI 10.1126/science.1178331
18. Locati M, Mantovani A, Sica A. Macrophage activation and polarization as an adaptive component of innate immunity. *Adv Immunol.* 2013;120:163-184. DOI 10.1016/B978-0-12-417028-5.00006-5
19. Murray PJ, Allen JE, Biswas SK, et al. Macrophage activation and polarization: nomenclature and experimental guidelines. *Immunity.* 2014;41(1):14-20. DOI 10.1016/j.immuni.2014.06.008
20. Li Y, Su Y, Zhou T, et al. Activation of the NLRP3 Inflammasome Pathway by Prokineticin 2 in Testicular Macrophages of Uropathogenic *Escherichia coli*-Induced Orchitis. *Front Immunol.* 2019;10:1872. Published 2019 Aug 14. DOI 10.3389/fimmu.2019.01872
21. Rival C, Lustig L, Iosub R, et al. Identification of a dendritic cell population in normal testis and in chronically inflamed testis of rats with autoimmune orchitis. *Cell Tissue Res.* 2006;324(2):311-318. DOI 10.1007/s00441-005-0129-5
22. Jacobo P, Guazzone VA, Jarazo-Dietrich S, et al. Differential changes in CD4+ and CD8+ effector and regulatory T lymphocyte subsets in the testis of rats undergoing autoimmune orchitis. *J Reprod Immunol.* 2009 Jul;81(1):44-54. DOI 10.1016/j.jri.2009.04.005. Epub 2009 Jun 10. PMID: 19520436.
23. Hedger MP, Meinhardt A. Local regulation of T cell numbers and lymphocyte-inhibiting activity in the interstitial tissue of the adult rat testis. *J Reprod Immunol.* 2000;48(2):69-80. DOI 10.1016/S0165-0378(00)00071-1
24. De Rose R, Fernandez CS, Hedger MP, et al. Characterisation of macaque testicular leucocyte populations and T-lymphocyte immunity. *J Reprod Immunol.* 2013;100(2):146-156. DOI 10.1016/j.jri.2013.09.003
25. Loveland KL, Klein B, Poeschl D, et al. Cytokines in Male Fertility and Reproductive Pathologies: Immunoregulation and Beyond. *Front Endocrinol (Lausanne).* 2017;8:307. Published 2017 Nov 20. DOI 10.3389/fendo.2017.0030
26. Tüttelmann F, Nieschlag E. Nosologie andrologischer Krankheitsbilder. In: Nieschlag E, Behre HM, Nieschlag S (eds.): *Andrologie – Grundlagen und Klinik der reproduktiven Gesundheit des Mannes*. 3rd edition. Heidelberg: Springer 2009; 90–96.
27. Mazumdar S, Levine AS. Antisperm antibodies: etiology, pathogenesis, diagnosis, and treatment. *Fertil Steril.* 1998;70(5):799-810. DOI 10.1016/S0015-0282(98)00302-1
28. Chamley LW, Clarke GN. Antisperm antibodies and conception. *Semin Immunopathol.* 2007;29(2):169-184. DOI 10.1007/s00281-007-0075-2
29. Verón GL, Molina RI, Tissiera AD, et al. Incidence of Sperm Surface Autoantibodies and Relationship with Routine Semen Parameters and Sperm Kinematics. *Am J Reprod Immunol.* 2016;76(1):59-69. DOI 10.1111/aji.12519
30. Weidner W, Pilatz A, Diemer T, et al. Male urogenital infections: impact of infection and inflammation on ejaculate parameters. *World J Urol.* 2013;31(4):717-723. DOI 10.1007/s00345-013-1082-7
31. WHO laboratory manual for the examination and processing of human semen. 5th edn. Geneva, 2010. 287 p. Available at: http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/44261/1/9789241547789_eng.pdf
32. Sapozhkova ZhYu, Eremin KI. Updates in protocol for human semen examination. *Russian Clinical Laboratory Diagnostics.* 2020; 65 (2):106-110. DOI 10.18821/0869-2084-2020-65-2-106-110. (In Russ).

33. Sapozhkova Zh, Eremin K, Dolgov V. Unification of procedures of cytochemical staining of human ejaculate to determine the true fertility of men. *Laboratornaya diagnostika. Vostochnaya Evropa*. 2020, 9(1–2):41–49. DOI 10.34883/PI.2020.9.1.026. (In Russ).
34. Sapozhkova ZhYu. Patent on Invention. Method of Microscopic Diagnostics of Sperm Quality after Ejaculate Sedimentation. 2019 г © 2 686685 <http://new.fips.ru>. (In Russ).
35. Sapozhkova ZhYu, Eremin KI. Patent on Invention. Method for combined measurement of concentration of peroxidase-positive cells (neutrophilic granulocytes) and sperm cells in human ejaculate using variations based on cytochemical staining. 2020 г © 2 726207. (In Russ).
36. Weidner W, Wagenlehner FM, Marconi M, Pilatz A, Pantke KH, Diemer T. Acute bacterial prostatitis and chronic prostatitis/chronic pelvic pain syndrome: andrological implications. *Andrologia*. 2008;40(2):105–112. DOI 10.1007/s00345-013-1082-7
37. Schuppe HC, Pilatz A, Hossain H, et al. Urogenital Infection as a Risk Factor for Male Infertility. *Dtsch Arztebl Int*. 2017;114(19):339–346. DOI 10.3238/arztebl.2017.0339
38. Clinical guidelines for andrology urology. Ed. by P.A. Scheplev. Moscow: Medforum, 2016. 120 p. (In Russ).
39. Sapozhkova ZhYu. VisionCyto® SpermSediment: New diagnostic possibilities of cytological examination of ejaculate sediment. Laboratory. Moscow, Labdiag. 2016, 1: 46. (In Russ).
40. Sapozhkova ZhJu, Shabalova IP, Kasojan KT. Issledovanie osadka jejakuljata v diagnostike infekcij, peredavaemyh polovym putem.: Uchebnoe posobie. M.: FGBOU DPO RMANPO MZ RF, 2017:27. ISBN 978-5-7249-2488-7. (In Russ).
41. Sapozhkova ZhJu, Makolin IA. OAO «Medicina», Shatalov Ju.N. NPCJeMP DZM Voprosy diagnostiki urogenital'nyh infekcij u muzhchin. Aktual'nye voprosy medicinskoj praktiki: sbornik nauchnyh trudov. Vypusk 2. M.: OAO «Medicina», 2018: 58–61. (In Russ).
42. Sapozhkova Z, Kasoyan K, Kovalchuk E, Shabalova I. Sperm Sediment Cytology: A New Technique for Diagnosing Occult Urologic Infections. *Acta Cytol*. 2017;61(3):247–251. DOI 10.1159/000469653
43. Pochernikov DG, Postovoytenko NT, Strelnikov AI. Comparative analysis of cell culture and molecular genetic testing of semen microbiota in male infertility. *Andrologiya i genital'naya khirurgiya = Andrology and Genital Surgery* 2019;20(2):40–7. DOI 10.17650/2070-9781-2019-20-2-40-47
44. Gillan L, Evans G, Maxwell WM. Flow cytometric evaluation of sperm parameters in relation to fertility potential. *Theriogenology*. 2005;63(2):445–457. DOI 10.1016/j.theriogenology.2004.09.024
45. Henkel R, Kierspel E, Stalf T, et al. Effect of reactive oxygen species produced by spermatozoa and leukocytes on sperm functions in non-leukocytospermic patients. *Fertil Steril*. 2005;83(3):635–642. DOI 10.1016/j.fertnstert.2004.11.022
46. Erenpreiss J, Hlevicka S, Zalkalns J, Erenpreisa J. Effect of leukocytospermia on sperm DNA integrity: a negative effect in abnormal semen samples. *J Androl*. 2002;23(5):717–723.
47. Jashnani K, Gundawar R, Kavishwar V, Parameshwar V. Fine-Needle Aspiration Cytology of the Testes for the Classification of Azoospermia and Its Value in the Assessment of Male Infertility. *Acta Cytol*. 2020;64(3):216–223. DOI 10.1159/000502790
48. Schenck U, Schill WB. Cytology of the human seminiferous epithelium. *Acta Cytol*. 1988;32(5):689–696.
49. Papić Z, Katona G, Skrabalo Z. The cytologic identification and quantification of testicular cell subtypes. Reproducibility and relation to histologic findings in the diagnosis of male infertility. *Acta Cytol*. 1988;32(5):697–706.
50. Foresta C, Varotto A, Scandellari C. Assessment of testicular cytology by fine needle aspiration as a diagnostic parameter in the evaluation of the azoospermic subject. *Fertil Steril*. 1992;57(4):858–865. DOI 10.1016/s0015-0282(16)54971-1

Поступила в редакцию / Received 06.06.2021

Принята к публикации / Accepted 03.07.2021

Вклад авторов.

Ж. Ю. Сапожкова – 100 % участия в разработке концепции и дизайна статьи, 50 % сбора материалов.

Г. А. Милованова – 50 % сбора материалов, 100 % участия в работе над компиляцией материалов, 80 % участия в оформлении статьи по правилам для авторов.

О. И. Пацап – 20 % участия в оформлении статьи по правилам для авторов, 100 % участия в написании абстрактов на русском и на английском языках.

Authors' contributions.

Zh. Yu. Sapozhkova – 100 % participation in the development of the concept and design of the article, 50 % of the materials collection.

G. A. Milovanova – 50 % of the materials collection, 100 % participation in the work of compiling materials, 80 % participation in the preparation of the manuscript according to the rules for authors.

O. I. Patsap – 20 % participation in the preparation of the manuscript according to the rules for authors, 100 % participation in the writing of abstracts in Russian and English.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Conflict of interest. The authors declare no conflict of interest.

Финансирование. Финансирование. Исследование проведено без спонсорской поддержки.

Financing. The study was conducted without sponsorship.

Сведения об авторах / Information about authors

Жанна Юрьевна Сапожкова – к.м.н, руководитель Международной Школы Цитологии и Медицинской Школы Инноваций, Москва, Россия; заведующий Подольским диагностическим центром, г. Подольск, Московская область, Россия.

Zhanna Yu. Sapozhkova – MD, PhD, International Cytology School, Head, Senior Lecturer, Moscow Russia; Privat Medical Centre of Podolsk, Moscow Region, Head of Clinical Lab, doctor/cytologist, Podolsk, Moscow Region, Russia.

E-mail: icsschool.2019@gmail.com. **SPIN РИНЦ:** 3191-4189

ORCID: 0000-0003-3068-2260

Галина Александровна Милованова – ординатор кафедры клинической лабораторной диагностики РМАНПО, Москва, Россия.

Galina A. Milovanova – Resident, Russian Medical Academy of Continuous Professional Education, Moscow, Russia.

E-mail: g.milovanova2018@gmail.com. **SPIN РИНЦ:** 7668-9460

ORCID: 0000-0002-0919-7271

Ольга Игоревна Пацап – к.м.н., заведующая патологоанатомическим отделением ФГБУ «Федеральный центр мозга и нейротехнологий» ФМБА, Москва, Россия.

Olga I. Patsap – MD, PhD, Federal Center of Brain Research and Neurotechnologies FMBA, Moscow, Russia.

E-mail: cleosnake@yandex.ru. **SPIN РИНЦ:** 6460-1758

ORCID: 0000-0003-4620-3922