

Количественный кариологический анализ незрелых половых клеток из эякулята при нормальной концентрации сперматозоидов

М.В. Андреева, М.И. Штаут, Л.Т. Добродеева, Т.М. Сорокина, В.Б. Черных, Л.Ф. Курило

ФГБНУ «Медико-генетический научный центр им. акад. Н.П. Бочкова»; Россия, 115522 Москва, ул. Москворечье, 1

Контакты: Любовь Федоровна Курило kurilo@med-gen.ru

Введение. Количество и соотношение незрелых половых клеток (НПК) разных стадий в эякуляте могут отражать прохождение мейоза и состояние сперматогенеза. Количественный кариологический анализ незрелых половых клеток (ККА НПК) из эякулята позволяет идентифицировать и анализировать все стадии дифференцировки клеток в процессе сперматогенеза.

Цель исследования – оценить состояние сперматогенеза у мужчин с нарушением фертильности и возможную связь параметров спермограммы с показателями ККА НПК.

Материалы и методы. Исследовали 52 образца эякулята с нормальной концентрацией сперматозоидов, нормальным объемом и pH. Выполняли стандартное спермиологическое исследование согласно рекомендациям Всемирной организации здравоохранения и ККА НПК эякулята (патент Л.Ф. Курило № 2328736, 2007 г.). По количеству лейкоцитов в эякуляте были выделены 2 группы: с нормальным содержанием лейкоцитов (1-я группа, $n = 34$) и с лейкоспермией (2-я группа, $n = 18$).

Результаты. Повышенный индекс НПК был определен в 56 % образцов 1-й группы и 61 % образцов 2-й группы. Выявлена положительная корреляция между количеством сперматоцитов I и концентрацией сперматозоидов (1-я группа), а также количеством сперматоцитов I и количеством морфологически нормальных сперматозоидов (2-я группа). Среднее количество нераззошедшихся сперматид во 2-й группе статистически значимо выше, чем в 1-й группе. Выявлена отрицательная корреляция между количеством нераззошедшихся сперматид и количеством морфологически нормальных форм сперматозоидов, а также концентрацией половых клеток (2-я группа). Повышенный индекс НПК обнаружен как при патозооспермии, так и при нормозооспермии.

Выводы. ККА НПК является самостоятельным методом оценки состояния сперматогенеза и может быть рекомендован как часть протокола обследования мужчин с нарушениями репродукции совместно со стандартным спермиологическим исследованием.

Ключевые слова: бесплодие, сперматогенез, патозооспермия, мейоз, незрелые половые клетки, эякулят

Для цитирования: Андреева М.В., Штаут М.И., Добродеева Л.Т. и др. Количественный кариологический анализ незрелых половых клеток из эякулята при нормальной концентрации сперматозоидов. Андрология и генитальная хирургия 2022;23(1):37–44. DOI: 10.17650/1726-9784-2022-23-1-37-44.

Quantitative karyological analysis of immature germ cells from ejaculate with normal sperm count

M.V. Andreeva, M.I. Shtaut, L.T. Dobrodeeva, T.M. Sorokina, V.B. Chernykh, L.F. Kurilo

Research Centre for Medical Genetics; 1 Moskvorechie St., Moscow 115522, Russia

Contacts: Lubov Fedorovna Kurilo kurilo@med-gen.ru

Introduction. The number of immature germ cells (IGCs) in ejaculate and the ratio of these cells at different stages of their differentiation can reflect meiotic progression and the state of spermatogenesis. Quantitative karyological analysis of immature germ cells from the ejaculate (QKA IGCs) makes it possible to distinguish and analyze all the stages of cell differentiation during spermatogenesis.

Purpose. To analyze the spermatogenesis in men with impaired fertility and possible correlation between semen analysis and QKA IGCs parameters.

Materials and methods. We analyzed 52 semen samples with normal sperm concentration, normal ejaculate volume and pH. Sperm examination according to WHO criteria and QKA IGCs from the ejaculate were performed (patent of L.F. Kurilo No. 2328736, 2007). According to the number of leukocytes, we divided two groups: a group with normal concentration of leukocytes in the ejaculate (group 1, $n = 34$) and a group with leukospermia (group 2, $n = 18$).

Results. Increased IGCs index was found in 56 % of the samples in group 1 and 61 % of the samples in group 2. A positive statistically significant correlation was found between the number of spermatocytes I and sperm concentration (group 1), as well as the number of spermatocytes I and morphologically normal spermatozoa (group 2). The average number of non-divided spermatids in group 2 was statistically higher than in group 1. A negative statistically significant correlation was found between the number of non-divided spermatids and the number of morphologically normal spermatozoa, as well as the concentration of germ cells (group 2). Increased IGCs index was found in both pathozoospermia and normozoospermia.

Conclusions. The QKA IGCs is an independent method for spermatogenesis evaluation and can be recommended as part of the protocol for examining men with reproductive disorders along with standard semen analysis.

Key words: infertility, spermatogenesis, pathozoospermia, meiosis, immature germ cells, ejaculate

For citation: Andreeva M.V., Shtaut M.I., Dobrodeeva L.T. et al. Quantitative karyological analysis of immature germ cells from ejaculate with normal sperm count. *Andrologiya i genital'naya khirurgiya* = *Andrology and Genital Surgery* 2022;23(1):37–44. (In Russ.). DOI: 10.17650/1726-9784-2022-23-1-37-44.

Введение

Первичным методом диагностики причин мужского бесплодия, оценки мужской фертильности и состояния сперматогенеза является стандартный спермиологический анализ, однако для определения статуса фертильности мужчины одного этого исследования во многих случаях недостаточно. Известно, что помимо сперматозоидов в эякуляте содержатся округлые клетки — лейкоциты и незрелые половые клетки (НПК), повышение количества которых может иметь клиническое значение. Увеличение числа лейкоцитов в эякуляте может указывать на наличие инфекции и воспалительного процесса половых желез или уrogenитального тракта у мужчин. При этом нормативные значения количества НПК и их связь с параметрами спермограммы до настоящего времени остаются дискуссионным вопросом.

Показано, что увеличение числа НПК в эякуляте может быть ассоциировано с отсутствием зачатия как при искусственном оплодотворении, так и при зачатии естественным путем [1, 2]. Следует отметить, что в своих работах иностранные коллеги анализируют исключительно общее количество НПК, не разделяя их по стадиям развития (дифференцировки). Российскими исследователями разработан метод, позволяющий идентифицировать клетки на всех стадиях сперматогенеза, как мейотических, так и пре- и постмейотических (патент Л.Ф. Курило № 2328736, 2007 г.) [3]. В отличие от стандартного спермиологического исследования, а также простого подсчета общего числа НПК, количественный кариологический анализ незрелых половых клеток (ККА НПК) из осадка эякулята позволяет определить стадии деления (дифференцировки) мужских половых клеток, а также нарушения прохождения клетками отдельных стадий — блок сперматогенеза [4]. Информативность метода ККА НПК при нарушениях сперматогенеза различной этиологии показана в опу-

бликованных ранее работах [4–8]. Оценка клеточного состава половых клеток в эякуляте с помощью ККА НПК особенно актуальна при отсутствии сперматозоидов в эякуляте (азооспермии) по данным стандартного спермиологического анализа или при крайне низкой концентрации сперматозоидов (олигозооспермии тяжелой степени), поскольку, в отличие от инвазивных методик (биопсии яичка или его придатка), может быть без риска осложнений использована для диагностических целей, в том числе для исследования состояния сперматогенеза в динамике [9, 10]. При этом данный анализ является информативным и для пациентов с нормальной концентрацией сперматозоидов.

Материалы и методы

Исследовали 52 образца эякулята пациентов, обратившихся в лабораторию генетики нарушений репродукции ФГБНУ «Медико-генетический научный центр им. акад. Н.П. Бочкова» в связи с нарушением фертильности. Выполняли стандартное спермиологическое исследование согласно международному руководству Всемирной организации здравоохранения [11] и ККА НПК эякулята (патент Л.Ф. Курило № 2328736, 2007 г.) [3]. Критериями включения в выборку являлись нормальные значения концентрации сперматозоидов, объема и уровня кислотности (рН) эякулята. По содержанию лейкоцитов образцы эякулята разделили на 2 группы — с нормальным количеством лейкоцитов (до 1 млн/мл, $n = 34$, 1-я группа) и лейкоспермией (более 1 млн/мл, $n = 18$, 2-я группа).

Для проведения ККА НПК использовали предварительно обработанные, фиксированные и окрашенные препараты клеток из осадка эякулята. Проводили идентификацию и подсчет ядер НПК на разных стадиях сперматогенеза и вычисляли долю (%) клеток каждой стадии от их общего числа. Количественно

оценивали следующие стадии развития НПК: сперматогонии, сперматоциты допахитенных стадий (клетки на стадиях прелептотены, лептотены, зиготены), сперматоциты в пахитене профазы I мейоза, сперматоциты в диплотене профазы I мейоза, сперматоциты в метафазах I и II мейоза (MI и MII), определяли суммарную долю (%) сперматоцитов II и сперматид, половые клетки в состоянии дегенерации (не идентифицируемые по стадиям). Кроме того, учитывали долю нераззошедшихся ядер НПК (процент от общего числа подсчитанных сперматоцитов II и сперматид). Индекс НПК рассчитывали как отношение количества НПК, найденных на 1000 сперматозоидов, к общему количеству половых клеток. Нормативные показатели ККА НПК (условный контроль) взяты из исследования показателей

эякулята мужчин контрольной группы (доноры спермы) [4]. Сравнение средних значений количественных признаков проводили с использованием *U*-критерия Манна–Уитни, корреляционный анализ — с помощью коэффициента корреляции Спирмана, сравнение частоты встречаемости качественных признаков — с помощью χ^2 -критерия Пирсона. Результаты считали статистически значимыми при значении $p < 0,05$.

Результаты

Средний возраст пациентов двух групп статистически значимо не различался и составил $32,8 \pm 6,0$ года (от 22 до 51 года) в 1-й группе и $33,1 \pm 5,3$ года (от 26 до 48 лет) во 2-й группе. Средние значения результатов спермограммы и ККА НПК представлены в табл. 1.

Таблица 1. Средние значения показателей стандартного спермиологического исследования и количественного кариологического анализа незрелых половых клеток исследованных образцов эякулята и нормативные показатели

Table 1. Mean values of standard semen analysis and quantitative karyological analysis of immature germ cells of the studied ejaculate samples and normal ranges

Сперматологические параметры Semen parameters	1-я группа (n = 34) Group 1 (n = 34)	2-я группа (n = 18) Group 2 (n = 18)	Нормативные показатели Normal range
	(M ± SD)		
Объем, мл Volume, ml	3,74 ± 1,53	4,23 ± 2,1	≥1,5 мл ≥1,5 ml
pH	7,56 ± 0,29	7,59 ± 0,18	≥7,2
Концентрация сперматозоидов, млн/мл Sperm concentration, million/ml	73,99 ± 42,84	101,17 ± 69,47	≥15 млн/мл ≥15 million/ml
Общее количество сперматозоидов в эякуляте, млн Total sperm count, million	266,16 ± 169,53	370,37 ± 308,02	≥39 млн ≥39 million
Живые сперматозоиды, % Live sperm, %	94,79 ± 4,4	91,39 ± 9,97	≥58 %
Морфологически нормальные сперматозоиды, % Morphologically normal sperm, %	4,62 ± 3,41	6 ± 4,77	≥4 %
Прогрессивно подвижные сперматозоиды (PR), % Progressive motility (PR), %	21,26 ± 11,91	19,33 ± 7,86	≥32 %
Подвижные сперматозоиды (PR + NP), % Total motility (PR + NP), %	36,56 ± 13,91	31,83 ± 8,77	≥40 %
Лейкоциты, млн/мл Leukocytes, million/ml	0,71 ± 0,29*	2,74 ± 1,7*	<1 млн <1 million
Количество НПК на разных стадиях (M ± SD), % Percentage of IGCs at different stages (M ± SD), %			
Индекс НПК IGCs index	5,31 ± 3,39	7,6 ± 8,53	2—4
В прелептотене-зиготене In preleptotene-zygotene	2,57 ± 2,27	3,34 ± 2,14	0,66 ± 0,16
В пахитене In pachytene	0,97 ± 1,12	0,83 ± 1,19	0,45 ± 0,10
В диплотене In diplotene	0,64 ± 1,22	0,68 ± 0,9	1,11 ± 0,26



Окончание табл. 1
End of table 1

Сперматологические параметры Semen parameters	1-я группа (n = 34) Group 1 (n = 34)	2-я группа (n = 18) Group 2 (n = 18)	Нормативные показатели Normal range
	(M ± SD)		
В диакинезе, MI, MII In diakinesis, MI, MII	0,01 ± 0,05	0 ± 0	0,04 ± 0,02
Сперматоциты II + сперматиды Spermatocytes II + spermatids	91,14 ± 6,45	87,4 ± 7,4	91,99 ± 0,89
Неразошедшиеся сперматиды Non-disjunction of spermatids	9,38 ± 6,42*	14,83 ± 8,94*	22,98 ± 2,65
Неидентифицированные половые клетки Unidentified germ cells	4,67 ± 4,00	7,74 ± 6,88	5,85 ± 0,85

*Средние значения статистически значимо различаются, $p < 0,05$.

*Mean values are statistically significantly different, $p < 0,05$.

Примечание. Здесь и в табл. 2: НПК — незрелые половые клетки.

Note. Here and in table 2: IGCs — immature germ cells.

Не выявлено статистически значимых различий в средних показателях спермограммы и ККА НПК между группами с нормальной концентрацией лейкоцитов и лейкоспермией, за исключением доли неразошедшихся ядер сперматид, которая была статистически значимо выше в группе с лейкоспермией ($p = 0,029$). В группе с повышенным содержанием лейкоцитов не встречались образцы с нормозооспермией, в то время как в группе с нормальной концентрацией лейкоцитов было 4 (12 %) таких образца. Предполагаем, что отсутствие различий в средних показателях спермограммы связано с большой вариативностью показателей в группах. Кроме того, следует отметить, что у пациентов с лейкоспермией не было острых воспалительных процессов на момент сдачи анализа.

Анализ коррелятивных связей показателей ККА НПК с показателями спермограммы отличался в двух группах. В группе с нормальной концентрацией лейкоцитов (1-я группа) выявлена положительная корреляция между количеством (%) НПК на стадии пахитены и концентрацией сперматозоидов ($r = 0,36$; $p = 0,035$) (табл. 2) и отрицательная корреляция между количеством (%) клеток на стадиях пахитены и диплотены и возрастом пациентов ($r = -0,36$; $p = 0,037$ и $p = 0,038$ соответственно). Таким образом, в данной группе большее количество НПК на стадии мейоза I наблюдали у пациентов с более высокой концентрацией сперматозоидов. Следует отметить, что выявленные закономерности нуждаются в проверке на большей выборке пациентов.

Таблица 2. Статистически значимая корреляция между показателями количественного кариологического анализа незрелых половых клеток (ККА НПК) и параметрами спермограммы

Table 2. Statistically significant correlation between quantitative karyological analysis of immature germ cells (QKA IGCs) and spermogram parameters

Параметры ККА НПК, % QKA IGCs parameters, %	Параметры спермограммы Spermogram parameters	Коэффициент корреляции Спирмана Spearman Correlation Coefficient	p
1-я группа (n = 34) Group 1 (n = 34)			
Сперматоциты I, стадия пахитены Spermatocytes I, pachytene	Концентрация сперматозоидов Sperm concentration	0,36	0,034
2-я группа (n = 18) Group 2 (n = 18)			
Сперматоциты I, стадии до пахитены Spermatocytes I, pre-pachytene stages	Морфологически нормальные формы Morphologically normal forms	0,53	0,024

Окончание табл. 2
End of table 2

Параметры ККА НПК, % QKA IGCs parameters, %	Параметры спермограммы Spermogram parameters	Коэффициент корреляции Спирмана Spearman Correlation Coefficient	<i>p</i>
Сперматоциты I, стадия пахитены Spermatocytes I, pachytene	Морфологически нормальные формы Morphologically normal forms	0,48	0,045
Сперматоциты I, стадия пахитены Spermatocytes I, pachytene	Общая подвижность сперматозоидов Total motility	0,59	0,01
Неразошедшиеся ядра НПК Non-disjoined IGCs nuclei	Концентрация сперматозоидов Sperm concentration	–0,50	0,033
Неразошедшиеся ядра НПК Non-disjoined IGCs nuclei	Общее количество сперматозоидов Total sperm count	–0,63	0,005
Неразошедшиеся ядра НПК Non-disjoined IGCs nuclei	Морфологически нормальные формы Morphologically normal forms	–0,52	0,028
Все образцы (<i>n</i> = 52) All samples (<i>n</i> = 52)			
Неразошедшиеся ядра НПК Non-disjoined IGCs nuclei	Концентрация лейкоцитов Leukocyte concentration	0,31	0,025
Неразошедшиеся ядра НПК Non-disjoined IGCs nuclei	Концентрация сперматозоидов Sperm concentration	–0,28	0,048
Неразошедшиеся ядра НПК Non-disjoined IGCs nuclei	Общее количество сперматозоидов Total sperm count	–0,33	0,017

В группе с лейкоспермией (2-я группа) выявлена положительная корреляция между количеством (%) НПК на стадии пахитены и количеством (%) морфологически нормальных форм, а также общей подвижностью (PR + NP) сперматозоидов ($r = 0,47$, $p = 0,045$ и $r = 0,59$, $p = 0,009$ соответственно). Также выявлена положительная корреляция между количеством (%) сперматоцитов I на стадиях прелептотены-зиготены и количеством (%) морфологически нормальных форм ($r = 0,53$, $p = 0,024$). Выявлена отрицательная корреляция между количеством (%) неразошедшихся ядер сперматид и количеством (%) морфологически нормальных форм ($r = -0,52$, $p = 0,028$). Кроме этого, выявлена отрицательная корреляция между количеством (%) неразошедшихся ядер сперматид и общим количеством сперматозоидов в эякуляте ($r = -0,63$, $p = 0,005$), а также концентрацией сперматозоидов ($r = -0,50$, $p = 0,033$). Нормальное содержание морфологически нормальных форм сперматозоидов (4 % и более) наблюдали в 11 (61 %) из 18 образцов 2-й группы, и ни в одном из этих образцов не выявлено повышенного содержания неразошедшихся ядер сперматид. При этом в образцах, в которых выявлено снижение количества морфологически нормальных форм сперматозоидов (тератозооспермия), в 43 % случаев наблюдали превышающее нормативные показатели количество

неразошедшихся сперматид. Повышенное количество НПК на допахитенных стадиях выявили в 91 % образцов с нормальной морфологией сперматозоидов и в 71 % образцов с тератозооспермией. Таким образом, во 2-й группе у большинства пациентов наблюдали частичный блок сперматогенеза на стадиях мейоза I, а тератозооспермия в ряде случаев была ассоциирована с остановкой сперматогенеза на поздних стадиях (на стадии мейоза II).

В целом повышенное количество неразошедшихся ядер сперматид было выявлено в 3 (16,7 %) из 18 образцов 2-й группы и не выявлено ни в одном из образцов 1-й группы, различие между группами по данному показателю является статистически значимым.

При анализе всех образцов ($n = 52$) выявлена положительная коррелятивная связь между концентрацией лейкоцитов и количеством (%) неразошедшихся ядер сперматид ($r = 0,31$, $p = 0,025$). Кроме этого, выявлена положительная коррелятивная связь между возрастом пациентов и количеством (%) неразошедшихся ядер сперматид ($r = 0,33$, $p = 0,022$). Отрицательную коррелятивную связь выявили между количеством неразошедшихся ядер сперматид и концентрацией и общим количеством сперматозоидов ($r = -0,28$, $p = 0,047$ и $r = -0,33$, $p = 0,017$ соответственно) (табл. 2).

Индекс НПК повышен в 19 (56 %) образцах из 1-й группы и в 11 (61,1 %) образцах из 2-й группы,



различия по частоте встречаемости повышенного индекса НПК в проанализированных группах статистически незначимы. Во всей обследованной группе ($n = 52$) повышенный индекс НПК был выявлен в 61 % образцов с астенозооспермией (17 из 28 образцов), 55 % образцов с астенотератозооспермией (11 из 20 образцов) и в 50 % образцов с нормозооспермией (2 из 4 образцов). Выраженное повышение индекса НПК у пациентов с нормозооспермией может свидетельствовать о частичном нарушении сперматогенеза у данных пациентов.

Обсуждение

Незрелые половые клетки являются одним из постоянных компонентов эякулята и, за исключением случаев необструктивной азооспермии, встречаются как в норме, так и при патологии. Тем не менее возможная связь НПК в эякуляте и фертильности до сих пор мало изучена, а анализ НПК не входит в стандартные протоколы обследования мужчин с бесплодием [11]. Некоторые исследователи считают, что включение подсчета концентрации НПК в рутинную спермограмму будет способствовать установлению причин мужского бесплодия [12]. Другие авторы полагают, что для оценки состояния сперматогенеза более информативным показателем является не концентрация НПК, а отношение их количества к общему числу половых клеток в эякуляте [13]. Показано, что у мужчин из супружеских пар, в которых зачатие наступало естественным путем, концентрация сперматозоидов, подвижность и количество морфологически нормальных форм были выше, чем в парах с бесплодием, при этом число НПК (подсчитанных на 100 сперматозоидов) в эякуляте мужчин, у партнерш которых наступала беременность, было статистически значимо ниже, чем у мужчин из пар с бесплодием [2]. При анализе наступления зачатий в циклах вспомогательных репродуктивных технологий было показано, что количество НПК в эякуляте мужчин, жены которых не смогли забеременеть с помощью методов искусственного оплодотворения, статистически значимо выше, чем у мужчин, от которых в результате использования вспомогательных репродуктивных технологий беременность наступила, при этом стандартные параметры спермограммы у данных пациентов не отличались [1].

Некоторые исследователи предполагают, что в нормальном эякуляте должно быть не более 2 % НПК, а в большом количестве они могут появляться в эякуляте в результате вирусных инфекций, а также при ряде других негативно влияющих на сперматогенез факторов, например варикоцеле [14, 15].

Работы, посвященные оценке связи параметров спермограммы и количества НПК в эякуляте, немногочисленны, а их результаты противоречивы. Сравнение результатов, полученных разными авторами, затруднено из-за отсутствия общепринятой методики анализа НПК и, как следствие, разных подходов к их оценке

у разных исследователей. В нашем исследовании не выявлено связи между индексом НПК и показателями спермограммы, при этом выявлена статистически значимая корреляция между количеством незрелых мужских половых клеток, находящихся на разных стадиях дифференцировки, и различными параметрами спермограммы, а обнаруженные коррелятивные связи отличались в группе пациентов с нормальным уровнем лейкоцитов и у мужчин с лейкоспермией. Следует отметить, что различия в связи параметров спермограммы и числа НПК у разных групп мужчин наблюдали и другие исследователи. Так, G. Arata de Bellabarba и соавт. (2000) выявили отрицательную коррелятивную связь между числом НПК и количеством сперматозоидов нормальной формы у пациентов с варикоцеле и не наблюдали такой корреляции в фертильной группе или у пациентов с бесплодием [16]. Другие авторы показали отрицательную корреляцию между общим количеством половых клеток, а также подвижностью сперматозоидов и числом НПК в эякуляте мужчин с бесплодием [12]. В работе M. Aurox (1984) отрицательную корреляцию между числом НПК и количеством сперматозоидов нормальной формы, напротив, наблюдали только у фертильных мужчин, у мужчин с бесплодием авторы выявили положительную корреляцию между данными параметрами [17].

В нашей работе в образцах с лейкоспермией выявлена отрицательная корреляция между количеством морфологически нормальных сперматозоидов и количеством неразощедшихся НПК, а также положительная корреляция между количеством морфологически нормальных сперматозоидов и количеством НПК на стадиях мейоза I. В группе с нормальной концентрацией сперматозоидов и лейкоцитов выявлена положительная корреляция концентрации сперматозоидов и НПК на стадии пахитены, в то время как в группе с лейкоспермией наблюдали отрицательную корреляцию между концентрацией сперматозоидов и числом неразощедшихся НПК.

Для более точной оценки возможной связи показателей стандартного спермиологического исследования и показателей ККА НПК (количества и доли незрелых мужских половых клеток в эякуляте, соотношения половых клеток на разных стадиях развития) необходимо продолжение исследования на больших выборках мужчин с различными сперматологическими параметрами.

Заключение

Нарушения развития мужских половых клеток могут встречаться даже при нормальном количестве сперматозоидов и/или нормозооспермии по результатам стандартного спермиологического исследования. ККА НПК из осадка эякулята является эффективным неинвазивным методом оценки состояния сперматогенеза и может быть использован для диагностики причин нарушения фертильности и мужского бесплодия.

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

- Tomlinson M.J., Barratt C.L., Bolton A.E. et al. Round cells and sperm fertilizing capacity: The presence of immature germ cells but not seminal leukocytes are associated with reduced success of in vitro fertilization. *Fertil Steril* 1992;58(6):1257–9. DOI: 10.1016/s0015-0282(16)55583-6.
- Tomlinson M.J., Barratt C.L., Cooke I.D. Prospective study of leukocytes and leukocyte subpopulations in semen suggests they are not a cause of male infertility. *Fertil Steril* 1993;60(6):1069–75. DOI: 10.1016/s0015-0282(16)56412-7.
- Курило Л.Ф. Способ цитологической диагностики нарушения сперматогенеза. Патент на изобретение № 2328736 от 01.02.2007. [Kurilo L.F. Method of cytological diagnostics of spermatogenic disorders. Patent No. 2328736 from 01.02.2007. (In Russ.)].
- Курило Л.Ф., Дубинская В.П., Остроумова Т.В. и др. Оценка сперматогенеза по незрелым половым клеткам эякулята. Проблемы репродукции 1995;3:33–8. [Kurilo L.F., Dubinskaya V.P., Ostroumova T.V. et al. Spermatogenesis evaluation using immature sex cells of the ejaculate. *Problemy reproduktcii* = Russian Journal of Human Reproduction 1995;3:33–8. (In Russ.)].
- Курило Л.Ф., Чеботарев А.Н., Шилейко Л.В. и др. Сравнительный анализ соотношения незрелых половых клеток на разных стадиях их дифференцировки в биоптате яичка и эякуляте у пациентов с азоо- и олигозооспермией. Проблемы репродукции 1997;1:80–4. [Kurilo L.F., Chebotarev A.N., Shileyko L.V. et al. Comparative analysis of the ratio between immature sex cells in different differentiation stages in testicular biopsy samples and ejaculates of patients with azoospermia and oligozoospermia. *Problemy reproduktcii* = Russian Journal of Human Reproduction 1997;1:80–4. (In Russ.)].
- Гаева Т.Н. Разработка метода количественного анализа незрелых половых клеток из эякулята и выяснение степени его информативности. Дис. ... канд. биол. наук. М., 1997. 124 с. [Gaeva T.N. Development of a method of quantitative analysis of immature germ cells in the ejaculate and assessment of its informative value. Diss. ... candidate of biol. sciences. Moscow, 1997. 124 p. (In Russ.)].
- Гришина Е.М. Характеристика сперматогенеза при некоторых генетически обусловленных и приобретенных нарушениях репродуктивной функции у мужчин. Дис. ... канд. мед. наук. М., 2004. 123 с. [Grishina E.M. Characteristics of spermatogenesis in some genetically determined and acquired disorders of reproductive function in men. Diss. ... candidate of medical sciences. Moscow, 2004. 123 p. (In Russ.)].
- Баранов В.С., Кузнецова Т.В. Цитогенетика эмбрионального развития человека: научно-практические аспекты. СПб.: Изд-во Н-Л, 2007. 640 с. [Baranov V.S., Kuznetsova T.V. Cytogenetics of human embryonic development: scientific and practical aspects. Saint Petersburg: Izd-vo N-L, 2007. 640 p. (In Russ.)].
- Андреева М.В., Хаят С.Ш., Шилейко Л.В. и др. Количественный кариологический анализ незрелых половых клеток из эякулята как часть протокола обследования мужчин с бесплодием в браке. Андрология и генитальная хирургия 2017;18(1):62–9. [Andreeva M.V., Khayat S.Sh., Shileyko L.V. et al. Quantitative karyological analysis of immature germ cells from ejaculate as part of examination of patients with infertility in marriage. *Andrologiya i genital'naya khirurgiya* = Andrology and Genital Surgery 2017;18(1):62–9. (In Russ.)]. DOI: 10.17650/2070-9781-2017-18-1-62-69.
- Сорокина Т.М., Андреева М.В., Штаут М.И. и др. Оценка состояния сперматогенеза у пациентов с азооспермией или криптозооспермией с помощью метода количественного кариологического анализа незрелых половых клеток. Андрология и генитальная хирургия 2019;20(1):75–81. [Sorokina T.M., Andreeva M.V., Shtaut M.I. et al. Quantitative karyological analysis of immature germ cells for the evaluation of spermatogenesis in patients with azoospermia or cryptozoospermia. *Andrologiya i genital'naya khirurgiya* = Andrology and Genital Surgery 2019;20(1):75–81. (In Russ.)]. DOI: 10.17650/2070-9781-2019-20-1-75-81.
- Руководство ВОЗ по исследованию и обработке эякулята человека. Пер. с англ. Н.П. Макарова. Науч. ред. Л.Ф. Курило. 5-е изд. М.: Капитал Принт, 2012. 291 с. [WHO laboratory manual for the examination and processing of human semen. Transl. from Engl. by N.P. Makarov. Ed. L.F. Kurilo. 5th edition. Moscow: Kapital Print, 2012. 291 p. (In Russ.)].
- Patil P.S., Humbarwadi R.S., Patil A.D., Gune A.R. Immature germ cells in semen – correlation with total sperm count and sperm motility. *J Cytol* 2013;30(3):185–9. DOI: 10.4103/0970-9371.117682.
- Caskurlu T., Tasci A.I., Samasti M. et al. Immature germ cells in semen and their correlations with other semen parameters. *Int Urol Nephrol* 1999;31(3):389–93. DOI: 10.1023/a:1007186405678.
- MacLeod J. A possible factor in the etiology of human male infertility: Preliminary report. *Fertil Steril* 1962;13:29–33. DOI: 10.1016/s0015-0282(16)34383-7.
- MacLeod J. Seminal cytology in the presence of varicocele. *Fertil Steril* 1965;16(6):735–57. DOI: 10.1016/s0015-0282(16)35765-x.
- Arata de Bellabarba G., Tortolero I., Villarroel V. et al. Nonsperm cells in human semen and their relationship with semen parameters. *Arch Androl* 2000;45(3):131–6. DOI: 10.1080/01485010050193896.
- Auroux M. Nonspermatozoal cells in human sperm: A study of 1243 subfertile and 253 fertile men. *Arch Androl* 1984;12(2–3):197–201. DOI: 10.3109/01485018409161176.

Вклад авторов

М.В. Андреева: разработка дизайна исследования, анализ данных, обзор публикаций по теме работы, написание текста статьи;
М.И. Штаут: выполнение спермиологического исследования и кариологического анализа, анализ полученных данных, научное редактирование текста статьи;
Л.Т. Добродеева: выполнение спермиологического исследования, анализ полученных данных, научное редактирование текста статьи;
Т.М. Сорокина, В.Б. Черных: обследование пациентов, анализ полученных данных, научное редактирование текста статьи;
Л.Ф. Курило: разработка и внедрение в практику метода количественного кариологического анализа незрелых половых клеток эякулята, разработка дизайна исследования, научное редактирование текста статьи.

Authors' contributions

M.V. Andreeva: research design development, data analysis, review of publications on the topic of the article, writing the text of the article;
M.I. Shtaut: performing spermiological research and karyological analysis, analysis of the data obtained, scientific editing of the text of the article;



L.T. Dobrodeeva: performing a spermiological study, analyzing the data obtained, scientific editing of the text of the article;
T.M. Sorokina, V.B. Chernykh: examination of patients, analysis of the data obtained, scientific editing of the text of the article;
L.F. Kurilo: development and implementation in practice of the method of quantitative karyological analysis of immature germ cells of the ejaculate, development of research design, scientific editing of the text of the article.

ORCID авторов / ORCID of authors

М.В. Андреева / M.V. Andreeva: <https://orcid.org/0000-0002-5048-5486>
М.И. Штаут / M.I. Shtaut: <https://orcid.org/0000-0002-0580-5575>
Л.Т. Добродеева / L.T. Dobrodeeva: <https://orcid.org/0000-0002-7805-2041>
Т.М. Сорокина / T.M. Sorokina: <https://orcid.org/0000-0002-4618-2466>
В.Б. Черных / V.B. Chernykh: <https://orcid.org/0000-0002-7615-8512>
Л.Ф. Курило / L.F. Kurilo: <https://orcid.org/0000-0003-3603-4838>

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.
Conflict of interest. The authors declare no conflict of interest.

Финансирование. Работа выполнена в рамках государственного задания Министерства науки и высшего образования Российской Федерации для ФГБНУ «Медико-генетический научный центр им. акад. Н.П. Бочкова».
Financing. The study was carried out within the framework of the state task of the Ministry of Science and Higher Education of the Russian Federation for N.P. Bochkov Research Centre for Medical Genetics.

Информированное согласие. Все пациенты подписали добровольное информированное согласие на участие в исследовании.
Informed consent. All patients gave written voluntary informed consent to participate in the study.