ОРИГИНАЛЬНЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ / RESEARCH ARTICLES

АВТОМАТИЗИРОВАННЫЙ И РУЧНОЙ АНАЛИЗ СПЕРМЫ: СРАВНИТЕЛЬНАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА

[1]Беляева Л.А., [1,2]Шурыгина О.В., [3]Юхимец С.Н., [2]Петрова А.А., [1]Миронов С.Ю., [4]Ратенкова Н.В., [1]Кулакова О.В., [1]Бовтунова С.С.

[1]Самарский государственный медицинский университет; [2]Медицинская компания ИДК; [3]Медицинский университет РЕАВИЗ, Самара; [4]Республиканский центр охраны здоровья семьи и репродукции, Махачкала, Россия, e-mail: llibel@mail.ru

Для цитирования:
Беляева Л.А., Шурыгина О.В., Юхимец С.Н., Петрова А.А., Миронов С.Ю., Ратенкова Н.В., Кулакова О.В., Бовтунова С.С. Автоматизированный и ручной анализ спермы: сравнительная характеристика. Морфологические ведомости. 2022;30(4):704. https://doi.org/10.20340/mv-mn.2022.30(4).704

Резюме. В настоящее время показатели спермограммы являются рутинными критериями оценки фертильности мужчин. Существует два метода анализа спермы: традиционный ручной и автоматизированный. Концентрация сперматозоидов различных категорий подвижности имеет важное значение при прогнозировании физиологического зачатия, а также выборе методов оплодотворения в программах вспомогательных репродуктивных технологий. Внедрение автоматических анализаторов спермы показало, что их использование можно рассматривать как альтернативу рутинному ручному методу анализа, что может способствовать лабораторной стандартизации. Первоначально эти приборы продемонстрировали трудности с точным указанием концентрации сперматозоидов из-за наличия агрегации сперматозоидов и большого количества клеточных обломков. В настоящем исследовании главное внимание было сосредоточено на анализе концентрации сперматозоидов ручным и автоматизированным способом. Всего было проведено анализов 50 образцов спермы, пациентов, участвующих в программах вспомогательных репродуктивных технологий. Ручной анализ проводили в камере Маклера по стандартной методике в 10 малых квадратах. Подвижность каждого сперматозоида классифицировали по категориям. Автоматизированный анализ проводился с помощью системы компьютерного анализа спермы с помощью анализатора спермы CASA (MICROPTIC, Испания), который использует принцип получения микроскопических изображений и их обработки для обнаружения подвижных и неподвижных сперматозоидов посредством получения быстрых и последовательных изображений. Для оценки полученных данных выбраны статистические методы для независимых переменных. В рамках проведенного исследования методом определения доверительных интервалов была обнаружена статистически значимая разница между автоматизированным и стандартным или ручным методами анализа при оценке сперматозоидов, обладающих наиболее высокой скоростью 0,025мм/с и прямолинейным и поступательным движением, а также с меньшей скоростью, либо стареющих, либо с нарушенной морфологией. Вероятнее всего, это связано с объективной трудностью визуальной оценки сперматозоидов таких категорий подвижности. Полученные данные позволяют предположить, что автоматизированный анализ обладает более высокой степенью объективности при оценке подвижных биологических объектов, в частности мужских половых клеток.

Ключевые слова: ***спермограмма, рутинный анализ, анализатор спермы, сперматозоиды, подвижность***

Статья поступила в редакцию 15 апреля 2022
Статья принята к публикации 15 августа 2022

AUTOMATED AND MANUAL SEMEN ANALYSIS: THE COMPARATIVE CHARACTERISTICS

[1]Belyaeva LA, [1,2]Shurygina OV, [3]Yukhimets SN, [2]Petrova AA, [1]Mironov SYu, [4]Ratenkova NV, [1]Kulakova OV, [1]Bovtunova SS

[1]Samara State Medical University; [2]Medical Company IDK; [3]Private Medical University REAVIZ, Samara; [4]Republican Family Health Protection and Reproduction Centre, Makhachkala, Russia e-mail: llibel@mail.ru

For the citation:
Belyaeva LA, Shurygina OV, Yukhimets SN, Petrova AA, Mironov SYu, Ratenkova NV, Kulakova OV, Bovtunova SS. Automated and manual semen analysis: the comparative characteristics. Morfologicheskie Vedomosti – Morphological newsletter. 2022;30(4):704. https://doi.org/10.20340/mv-mn.2022.30(4).704

Summary. Currently, spermogram parameters are routine criteria for assessing male fertility. There are two methods of semen analysis: traditional manual and automated. The concentration of spermatozoa of various motility categories is important in predicting physiological conception, as well as in choosing fertilization methods in assisted reproductive technology programs. The introduction of automatic semen analyzers has shown that their use can be considered as an alternative to the routine manual analysis method, which can contribute to laboratory standardization. Initially, these devices demonstrated difficulty in accurately indicating sperm concentration due to the presence of sperm aggregation and large amounts of cellular debris. In the present study, the main focus was on the analysis of sperm concentration by manual and automated methods. A total of 50 sperm samples were analyzed from patients participating in assisted reproductive technology programs. Manual analysis was performed in a Makler's chamber according to the standard method in 10 small squares. The motility of each spermatozoon was classified into categories. Automated analysis was carried out using the CASA sperm analyzer computer analysis system (MICROPTIC, Spain), which uses the principle of microscopic imaging and processing to detect motile and immobile spermatozoa through fast and consistent images. Statistical methods for independent variables were chosen to evaluate the obtained data. As part of the study, by the method of determining confidence intervals, a statistically significant difference was found between automated and standard or manual methods of analysis when evaluating spermatozoa with the highest speed of 0,025 mm/sec and rectilinear and translational movements, as well as with a lower speed, either aging or with broken morphology. Most likely, this is due to the objective difficulty of visual assessment of spermatozoa of such motility categories.

The data obtained suggest that automated analysis has a higher degree of objectivity in assessing mobile biological objects, in particular male germ cells.

Key words: ***spermogram, routine analysis, sperm analyzer, spermatozoa, mobility***

Article received 15 April 2022
Article accepted August 2022

Введение. Исследование эякулята является наиболее простым и доступным методом лабораторного исследования фертильности мужчин. Спермограмма является результатом исследования физических, количественных, биохимических, иммунологических и морфологических показателей эякулята [1]. Существует два метода анализа спермы: ручной и автоматизированный, с помощью анализаторов SQA-V и CASA. В большинстве лабораторий вручную оценивают сперму под микроскопом. Однако традиционный ручной анализ спермы имеет ограничения, о чем свидетельствуют исследования, демонстрирующие межлабораторную вариабельность, приводящую к противоречивым результатам, которые в свою очередь могут привести к неверной диагностике или отсрочке лечения бесплодных пар [2]. Внедрение автоматических анализаторов спермы показало, что их можно рассматривать как альтернативный подход к рутинному ручному анализу спермы, который может способствовать лабораторной стандартизации. Первоначально эти системы продемонстрировали трудности с точным указанием концентрации сперматозоидов из-за наличия агрегации сперматозоидов и большого количества фонового дебриса (клеточного мусора) [3-4].

В нашем исследовании мы использовали результаты компьютерного анализа спермы (CASA, MICROPTIC, Spain), существующего с 1985 года. Технология CASA в основном оценивает характеристики движения сперматозоидов. Основная проблема автоматической системы CASA заключается в истинной идентификации и дифференцировке сперматозоидов от других объектов аналогичного размера, таких как круглые клетки, цитоплазматические капли и клеточный мусор [5]. По данным современных исследований существует корреляция между содержанием прогрессивно-подвижных и нормальных морфологических форм [1, 6-7]. Ранние исследования демонстрировали положительную корреляцию между процентом сперматозоидов с нормальной морфологией и частотой зачатия, однако в поздних работах эти результаты не нашли подтверждения. Исследование строения сперматозоидов на сегодняшний день часто остается отправной точкой обследования мужчины по поводу бесплодия. Однако имеющиеся данные не подтверждают роли этого фактора в выборе метода вспомогательных репродуктивных технологий или прогнозировании их результатов. Таким образом, данные о прогностической значимости исследования морфологии сперматозоидов противоречивы [8]. Авторы решили сосредоточиться на анализе концентрации сперматозоидов ручным и автоматизированным способом.

Цель исследования: определить наличие или отсутствие различий данных при выполнении спермограммы ручным и автоматизированным способом.

Материалы и методы исследования. Всего было проведен анализ 50 образцов спермы. Все пациенты проходили первичное обследование в отделении экстракорпорального оплодотворения (ЭКО) Клинического госпиталя ИДК «Мать-и-дитя» (г. Самара). Один образец спермы был разделен на две порции: для ручного проведения спермограммы (I группа) и автоматизированного анализа (II группа). Микроскопическое исследование эякулята проводили после полного его разжижения. Ручной анализ проводили в камере Маклера по стандартной методике в 10 малых квадратах. В соответствии с рекомендациями ВОЗ различают следующие категории сперматозоидов: категория А - движение сперматозоида прямолинейное и поступательное, скорость выше 0,025 мм/с; категория В - сперматозоид движется прямолинейно, но его скорость меньше 0,025 мм/с, как правило, это сперматозоиды либо стареющие, либо с нарушенным строением; категория С - сперматозоид вращается на месте или по кругу, то есть его движение не поступательное; катего-

рия D - сперматозоид неподвижен (азооспермия). Примерно 50% всех сперматозоидов группы D — это старые спермии, которые либо уже погибли, либо погибают. Подвижность каждого сперматозоида в настоящем исследовании классифицировали по указанным выше категориям. Сначала подсчитывали все сперматозоиды категорий «A» и «B» в 10 малых квадратах в %. Далее в той же области подсчитывают сперматозоиды с непоступательным движением категории «C» в% и неподвижные сперматозоиды категории «D».

Автоматизированный анализ проводился с помощью системы компьютерного анализа спермы на анализаторе спермы CASA (MICROPTIC, Испания), который использует принцип получения микроскопических изображений и их обработки для обнаружения подвижных и неподвижных сперматозоидов посредством получения быстрых и последовательных кадров. При автоматизированном анализе подвижности сперматозоидов с помощью системы CASA оцениваются кинематические параметры сперматозоидов, например, VCL (скорость криволинейного движения), LIN (линейность), ALH (амплитуда латерального смещения головки) and STR (прямолинейность), которые важны для определения: прогрессивной подвижности сперматозоида и циркулярной подвижности. CASA обеспечивает дифференциацию на быстрые прогрессивные сперматозоиды; быстрые, но менее прогрессивные; медленные непрогрессивные; неподвижные. Эти количественные измерения используются для точного отнесения к тому или иному классу в соответствии с ВОЗ 4/5. Статистический анализ проводился с использованием программы RStudio (R v.3.6.3, RStudio v.1.1.463). Описательная статистика для непрерывных данных рассчитывалась как среднее значение и 95% доверительные интервалы; для непараметрических данных как медиана, квартили и межквартильный диапазон. Несмотря на то, что данные не соответствовали нормальному распределению, в группах было больше 30 наблюдений, что, согласно центральной предельной теореме, позволяет нам использовать среднее значение и 95% доверительные интервалы для описания переменных. При оценке различий в непараметрических группах данных использовались критерий Манна-Уитни для двух групп сравнения. Для оценки различий в процентах использовался критерий χ^2. Данные были разделены на группы по способам оценки на группу автоматизированного и группу ручного подсчета. Расчет размера выборки был основан на пилотном исследовании и рассчитан с использованием формулы для теста пропорции; уровень $p<0,05$ считался статистически достоверным и указан для групп сравнения, в которых он был достигнут.

Результаты исследования и обсуждение. Средний возраст пациентов в рамках проведенного исследования составил 36 лет. Распределение пациентов по возрасту представлено на рис. 1.

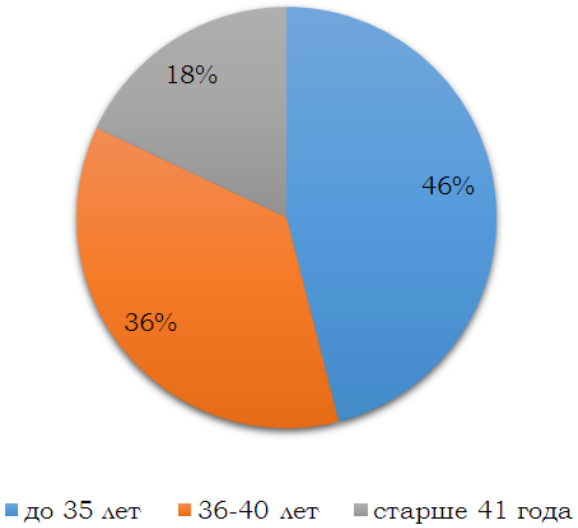

Рис. 1. Распределение исследованных пациентов по возрасту

С помощью статистического анализа при сопоставлении двух групп по анализируемым параметрам (концентрация, процентное соотношение категорий сперматозоидов по уровню подвижности) было показано, что метод 95% доверительных интервалов указывает на разницу между автоанализом и ручным способами оценки спермы в отдельных категориях (таблица 1). Так, обнаружена статистически значимая разница между автоматизированным и ручным анализом в группе сперматозоидов категории A в 5,31 (95%

ДИ: 3,31-7,31) против 11,31 (95% ДИ: 8,37-14,65, p<0,001) и в группе A+B - 22,13 (95% ДИ: 16,37-27,88, p<0,001) против 28,08 (95% ДИ: 22,73-33,43, p=0,036). Вероятнее всего это связано с объективной трудностью визуальной оценки сперматозоидов категории А, обладающих наиболее высокой скоростью и требующих большого опыта персонала для их оценки. Статистически значимая разница для группы A+B, судя по всему, объясняется влиянием данных за счет группы А. Показатели в группе ручного анализа значимо выше по категории А и почти в 2 раза выше в категории С - 26,71 (95% ДИ: 22,51-30,91, p<0,001) против 20,12 (95% ДИ: 17,29-22,94, p=0,079). Полученные данные позволяют нам предположить, что автоматизированный анализ обладает более высокой степенью объективизации данных при оценке подвижных биологических объектов, в данном случае - мужских гамет.

Помимо анализа с определением доверительных интервалов, мы провели также попарное сравнение групп категорий сперматозоидов при автоматизированном и ручном способах оценки с определением коэффициента Манна-Уитни для непараметрических выборок (таблица 2).

Таблица 1

Сравнение методом доверительных интервалов основных показателей эякулята при использовании автоматизированного и ручного способов оценки

Показатели	Группа	N	Mean	SE	Lower	Upper	Med	SD	IQR	W	p=
Общая концентрация клеток	auto	50	64,25	7,46	49,63	78,87	56,14	52,73	75,05	0,87	<0,001
	manual	50	62,08	6,79	48,77	75,39	55,50	48,00	69,75	0,88	<0,001
A	auto	50	5,31	1,02	3,31	7,31	2,21	7,20	5,75	0,73	<0,001
	manual	50	11,51	1,60	8,37	14,65	9,00	11,33	14,57	0,88	<0,001
B	auto	50	16,80	2,12	12,65	20,96	13,26	14,98	21,34	0,88	<0,001
	manual	50	16,55	1,76	13,09	20,01	13,40	12,47	18,42	0,93	0,004
A+B	auto	50	22,13	2,94	16,37	27,88	15,56	20,76	27,09	0,87	<0,001
	manual	50	28,08	2,73	22,73	33,43	24,00	19,31	30,75	0,95	0,036
C	auto	50	26,71	2,14	22,51	30,91	24,10	15,15	13,55	0,81	<0,001
	manual	50	20,12	1,44	17,29	22,94	19,50	10,19	13,00	0,96	0,079
D	auto	50	51,18	3,77	43,80	58,57	54,20	26,64	43,00	0,95	0,029
	manual	50	51,56	3,54	44,61	58,50	50,20	25,04	38,45	0,97	0,169

Примечание: auto – автоматический анализ; manual – ручной способ подсчета сперматозоидов; N – число наблюдений, Mean – средняя арифметическая, SE – ошибка средней, Lower – нижний квартиль, Upper – верхний квартиль, Med – медиана, SD – среднее квадратичное отклонение, IQR – межквартильный размах, W – значение критерия Манна-Уитни, p – значение уровня достоверности различий

При сравнении показателей двух групп по категориям сперматозоидов «A+B» почти достигнута статистически значимая разница. Статистически достоверная разница при сравнении показателей для ручного и автоматизированного анализа данных, обнаруживается также при подсчете сперматозоидов категории «А» и «С», несмотря на то, что доверительные интервалы для категории «С» пересекаются. Таким образом, в целом с помощью статистических методов анализа, удалось определить значимую разницу показателей при автоматизированном и ручном способах оценки эякулята для сперматозоидов категории «А». Для категории «A+B» методом доверительных интервалов также была обнаружена статистически значимая разница, которая имеет относительное подтверждение при расчете критерия различий Манна-Уитни. При сравнении двух способов оценки эякулята при расчете критерия различий Манна-Уитни для категории сперматозоидов категории «С» обнаружена статически значимая разница, которая была по-

чти достигнута в настоящем исследовании методом сравнительных интервалов. Возможно, большее количество исследований может достичь более статистически значимой разницы. В нашем исследовании обнаружена положительно значимая корреляция между двумя основными показателями спермограммы - общей их концентрацией и концентрацией разных категорий сперматозоидов, преимущественно средней и умеренной силы при обоих методах исследованиях эякулята. Отрицательная корреляция при использовании ручного и автоматизированного методов обнаружена для показателя концентрации сперматозоидов категории «D» и общей концентрации клеток в эякуляте.

Таблица 2

Показатели основных параметров эякулята при использовании автоматизированного и ручного способов оценки с определением коэффициента Манна-Уитни

Показатели	Статистический критерий	Значение критерия	Число степеней свободы	p=	Средняя разница	Ошибка средней разницы
Объем	Student's t Mann-Whitney U	0,00 1250,00	98,00	1,000 1,000	0,00 0,00	0,19
Общая концентрация клеток	Student's t Mann-Whitney U	0,22 1247,00	98,00	0,830 0,986	2,17 0,16	10,08
A	Student's t Mann-Whitney U	–3,27 842,50	98,00	0,002 0,005	–6,20 –4,51	1,90
B	Student's t Mann-Whitney U	0,09 1187,50	98,00	0,927 0,669	0,25 –0,89	2,76
AB	Student's t Mann-Whitney U	–1,48 983,50	98,00	0,141 0,067	–5,95 06,36	4,01
C	Student's t Mann-Whitney U	2,55 874,00	98,00	0,012 0,010	6,59 5,33	2,58
D	Student's t Mann-Whitney U	–0,07 1242,00	98,00	0,943 0,959	–0,37 0,29	5,17

Заключение. Спермограмма является универсальным критерием для определения оплодотворяющей способности спермы у мужчины и позволяет проанализировать активность и функциональное состояние половых клеток и, как следствие, оценить репродуктивные способности мужчины, принять решение о необходимости лечения и разработать его тактику [9-19]. В соответствии с результатами проведенного исследования с использованием метода определения доверительных интервалов, применение автоматизированного анализа спермограммы позволяет более объективно выделить сперматозоиды категории «A» в исследуемом образце. Концентрация сперматозоидов категорий «A+B» также показывает статистически достоверную разницу при сравнении результатов автоматизированного и ручного способа оценки в пользу первого. Эти категории сперматозоидов определяют оплодотворяющую способность эякулята. На основании полученных данных, кроме прогнозирования самостоятельного зачатия, в практике эмбриологических лабораторий выбирается метод оплодотворения. Правильно выбранный метод предотвращает отсутствие или низкий показатель оплодотворения, а также влияет на количество эмбрионов, которое может быть получено и использовано для переноса в полость матки и/или криоконсервации в циклах лечения бесплодия.

Литература
References

1. *Potekhina ES, Mikhaylyuk EV, Nepomnyashchikh AS. Spermogramma kak instrument otsenki muzhskoy fertil'nosti. Nauchnoe obozrenie. Meditsinskie nauki. 2020;1:11-14. In Russian*
2. *Auger J et al. Intra- and inter-individual variability in human sperm concentration, motility and vitality assessment during a workshop involving ten laboratories. Hum Reprod. 2000;15:2360-2368*
3. *Cooper TG et al. World Health Organization reference values for human semen characteristics. Hum Reprod Update. 2010;16:231-245. https://doi.org/10.1093/humupd/dmp048*
4. *Agarwal A, Sharma RK. Automation is the key to standardized semen analysis using the automated SQA-V sperm quality analyzer. Fertil Steril. 2007;87:156-162. https://doi.org/10.1016/j.fertnstert. 2006.05.083*
5. *Bioenvironmental Issues Affecting Men's Reproductive and Sexual Health. Eds: Suresh C. Sikka and Wayne J. G. Hellstrom.- London: Elsevier/Academic Press, 2018.- 596pp*
6. *Leont'eva OA, Vorob'eva OA. Sravnitel'nyy analiz morfologii spermatozoidov cheloveka. Russky meditsinsky sever. 1999;3. In Russian*
7. *Zhabin SG, Trechenkov EA, Artifeksov SB i dr. Sravnitel''naya otsenka urovnya dnk-fragmentatsii i drugikh pokazateley fertil''nosti eyakulyata. Problemy reproduktsii. 2015;21(4):121-124. In Russian*
8. *Olefir JuV, Monakov DM. Klinicheskoe znachenie morfologii spermatozoidov v vybore metoda lecheniya muzhskogo besplodiya. Eksperimental'naya i klinicheskaya urologiya 2021;14(3):127-132. In Russian*
9. *Muzhskoe besplodie. Klinicheskie rekomendatsii. M.: Rossiyskoe obshchestvo urologov, 2021.- 25s. URL: http://disuria.ru/_ld/10/1013_kr21N46mz.pdf. In Russian*
10. *Bozhedomov VA, Lipatova NA, Sporish EA I dr. Rol' strukturnykh narusheny khromatina i DNK spermatozoidov v razvitii besplodiya. Andrologiya i genital'naya khirurgiya. 2012;13(3):82-92. In Russian*
11. *Matthew S Wosnitzer, Goldstein M. Obstructive azoospermia. Urol Clin North Am. 2014;41(1):83-95*
12. *Sperm retrieval for obstructive azoospermia. Practice Committee of the American Society for reproductive. Medicine. Fertil Steril. 2006;86(5)Suppl 1:115-120*
13. *Gamidov SI, Popova AJu, Gasanov NG i dr. Rol' metodov khirurgicheskogo polucheniya spermatozoidov u patsientov s azoospermiey v programmakh vspomogatel'nykh reproduktivnykh tekhnologiy (obzor literatury). Andrologiya i genital'naya khirurgiya. 2018;19(3):27-34. In Russian*
14. *Gasanov NG, Gamidov SI, Shatylko TV i dr. Reproduktivny potentsial spermatozoidov, poluchennykh khirurgicheskim putyom u patsientov s azoospermiey. Eksperimental'naya i klinicheskaya urologiya. 2019;(3):126-132. In Russian. https://doi.org/10.29188/2222-8543-2019-11-3-126-132*
15. *WHO laboratory manual for the examination and processing of human semen. Fifth ed. WHO, 2010.- 271 pp*
16. *Odintsov AA, Kuchkov IN, Cherkashina IV, Potemina TE. Ispol'zovanie pentoksifillina v protsedure intratsitoplazmaticheskoy in'ektsii spermiya (ICSI). Sovremennye tekhnologii v meditsine. 2010;(3):53-55. In Russian*
17. *Mangoli V, Mangoli R, Dandekar S, et al. Selection of viable spermatozoa from testicular biopsies: a comparative study between pentoxifylline and hypoosmotic swelling test. Fertil Steril. 2011;95(2):631-634. https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2010.10.007*
18. *Nordhoff V. How to select immotile but viable spermatozoa on the day of intracytoplasmic injection? An embryologist's view. Andrology. 2015;(2):156-162. https://doi.org/10.1111/andr.286*
19. *The Vienna consensus: report of an expert meeting on the development of ART Laboratory performance indicators, ESHRE Special Interest Group of embryology and Alpha Scientists in Reproductive Medicine. Reprod Biomed Online. 2017;35(5):494-510. https://doi.org/10.1016/j.rbmo.2017.06.015*

Авторы заявляют об отсутствии каких-либо конфликтов интересов при планировании, выполнении, финансировании и использовании результатов настоящего исследования

The authors declare that they have no conflicts of interest in the planning, implementation, financing and use of the results of this study

ИНФОРМАЦИЯ ОБ АВТОРАХ

Беляева Лидия Александровна, аспирант кафедры гистологии и эмбриологии, Самарский государственный медицинский университет, Самара, Россия;
e-mail: llibel@mail.ru

Шурыгина Оксана Викторовна, доктор медицинских наук, профессор кафедры гистологии и эмбриологии, профессор кафедры репродуктивной медицины, клинической эмбриологи и генетики, Самарский государственный медицинский университет, заведующая эмбриологической лабораторией Клинического госпиталя ИДК «Мать и дитя», Самара, Россия;
e-mail: oks-shurygina@yandex.ru

Юхимец Сергей Николаевич, кандидат медицинских наук, доцент, доцент кафедры морфологии и патологии, Медицинский университет РЕАВИЗ, Самара, Россия;
e-mail: y_s_n@reaviz.com

Петрова Альбина Анатольевна, эмбриолог, Медицинская компания ИДК, Самара, Россия;
e-mail: pathologywinkie@gmail.com

Миронов Сергей Юрьевич, соискатель ученой степени кандидата наук кафедры гистологии и эмбриологии, Самарский государственный медицинский университет, Самара, Россия; **e-mail: mironov0511@mail.ru**

INFORMATION ABOUT AUTHORS

Lidiya A. Belyaeva, Aspirantin of the Department of Histology and Embryology of the Samara State Medical University, Samara, Russia;
e-mail: llibel@mail.ru

Oksana V. Shurygina, Doctor of Medical Sciences, Professor of the Department of Histology and Embryology and Professor of the Department of Reproductive Medicine, Clinical Embryology and Genetics of the Samara State Medical University; Head of the Embryological Laboratory of the Clinical Hospital IDK «Mother and Child»,
Samara, Russia;
e-mail: oks-shurygina@yandex.ru

Sergey N. Yukhimets, Candidate of Medical Sciences, Docent, Associate Professor of the Department of Morphology and Pathology, Private Medical University REAVIZ, Samara, Russia;
e-mail: y_s_n@reaviz.com

Albina A. Petrova, Embryologist of the IDK Medical Company, Samara, Russia;
e-mail: pathologywinkie@gmail.com

Sergey Y. Mironov, Science Degree Applicant of the Department of Histology and Embryology, Samara State Medical University,
Samara, Russia; **e-mail: mironov0511@mail.ru**

Ратенкова Наталья Васильевна, старший эмбриолог, Республиканский центр охраны здоровья семьи и репродукции, Махачкала, Россия; **e-mail: ratenkova333@mail.ru**

Кулакова Олеся Викторовна, кандидат медицинских наук, доцент кафедры гистологии и эмбриологии, Самарский государственный медицинский университет, Самара, Россия; **e-mail: pathologywinkie@gmail.com**

Бовтунова Светлана Сергеевна, ассистент кафедры гистологии и эмбриологии, Самарский государственный медицинский университет, Самара, Россия;
e-mail: s.s.bovtunova@samsmu.ru

Natal'ya V. Ratenkova, Senior Embryologist of the Republican Family Health Protection and Reproduction Centre, Makhachkala, Russia;
e-mail: ratenkova333@mail.ru

Olesya V. Kulakova, Candidate of Medical Sciences, Associate Professor of the Department of Histology and Embryology, Samara State Medical University, Samara, Russia;
e-mail: pathologywinkie@gmail.com

Bovtunova Svetlana Sergeevna, Assistant of the Department of Histology and Embryology, Samara State Medical University, Samara, Russia;
e-mail: s.s.bovtunova@samsmu.ru