

(рис. 2–4). В контрольной группе практически здоровых лиц и у больных CD23-позитивной лимфомой мантийной зоны данная зависимость отсутствовала.

Выводы. 1. Использование сочетания маркеров CD35/CD21 в диагностической панели цитофлуориметрического анализа В-ЛПЗ позволяет не только получить дополнительную информацию об иммунологической характеристике опухолевых клеток, но и рассматривать экспрессию данных антигенов как дифференциально-диагностический признак.

2. Установлена прямая корреляционная зависимость плотности экспрессии антигенов CD21 и CD200 у больных В-ХЛЛ.

3. Более низкая частота экспрессии маркера CD35 и наличие экспрессии антигена CD200 при атипичной CD23-позитивной ЛКЗМ по сравнению с таковыми у больных CD23-отрицательной ЛКЗМ указывают на необходимость дальнейшего изучения патогенеза данной лимфомы.

ЛИТЕРАТУРА

1. Асатуров И. А. Иммунофенотипирование в диагностике хронических лимфопролиферативных заболеваний: Дис. ... канд. мед. наук. М.; 1997.
2. Волкова М. А., ред. Клиническая онкогематология: Руководство для врачей. 2-е изд. М.: ОАО «Издательство «Медицина»; 2007.
3. Луговская С. А., Морозова В. Т., Почтарь М. Е., Долгов В. В. Лабораторная гематология. Тверь: «Триада»; 2006.
4. Волкова М. А., ред. Редкие гематологические болезни и синдромы. М.: Практическая медицина; 2011.
5. Бэйн Б. Дж., Гупта Р. Справочник гематолога. А–Z: под ред. О. А. Рукавицына. М.: БИНОМ. Лаборатория знаний; 2010.
6. Gambell P., Cargo C., Nguyen V et al. CD200 expression using flow cytometry in B-cell lymphoproliferative diseases. *Int. J. Lab. Hematol.* 2011; 33(Suppl. 1): 51–2.

REFERENCES

1. Astsurov I. A. Immunophenotyping in the Diagnosis of Chronic Lymphoproliferative Diseases: Diss. Moscow; 1991. (in Russian)
2. Volkova M. A., ed. Clinical Oncohaematology: Guide for Doctors. 2-nd ed. Moscow: "Izdatel'stvo "Meditsina""; 2007. (in Russian)
3. Lugovskaya S. A., Morozova V. T., Pochtar' M. E., Dolgov V. V. Laboratory Hematology [Laboratornaya gematologiya]. Tver': Triada; 2006. (in Russian)
4. Volkova M. A., ed. Rare Hematologic Diseases and Syndromes. Moscow: Prakticheskaya meditsina. 2011. (in Russian)
5. Beyn B. Dzh., Gupta R. Handbook of Hematologist. A-Z: ed. O. A. Rukavitsyn. Moscow: BINOM. Laboratoriya znaniy; 2010. (in Russian)
6. Gambell P., Cargo C., Nguyen V et al. CD200 expression using flow cytometry in B-cell lymphoproliferative diseases. *Int. J. Lab. Hematol.* 2011; 33(Suppl. 1): 51–2.

Поступила 11.08.14

Received 11.08.14

ОБЩЕКЛИНИЧЕСКИЕ МЕТОДЫ

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2015

УДК 612.616.08

Татару Д. А.^{1,2}, Маркова Е. В.¹, Осадчук Л. В.², Шеина Ю. И.³, Светлаков А. В.¹

ОПТИМАЛЬНЫЕ УСЛОВИЯ ХРАНЕНИЯ СПЕРМАТОЗОИДОВ ДЛЯ АНАЛИЗА ФРАГМЕНТАЦИИ ДНК

¹ООО «Красноярский центр репродуктивной медицины», Россия, 660037, г. Красноярск; ²ФГБУН Институт цитологии и генетики СО РАН, Россия, 630090, г. Новосибирск; ³ООО «Новосибирский центр репродуктивной медицины», Россия, 630037, г. Новосибирск

Исследование уровня фрагментации ДНК сперматозоидов методом проточной цитометрии для оценки мужской фертильности все чаще начинает применяться в клинической диагностике, однако создание оптимального протокола хранения и подготовки сперматозоидов для анализа до сих пор находится на стадии экспериментальной разработки. Цель исследования – изучить влияние различных условий подготовки эякулята для адекватной оценки индекса фрагментации ДНК (ИФД) сперматозоидов методом SCSA (sperm chromatin structure assay). У 20 пациентов Красноярского центра репродуктивной медицины оценивали ИФД методом SCSA в свежем нативном эякуляте и после хранения сперматозоидов при различной температуре (37, 25, 4 °С) и длительности (1–2 и 1–3 сут) и условий хранения (при -20 или -70 °С) замороженных сперматозоидов (в виде нативного эякулята или в TNE-буфере). Показано, что ИФД существенно не меняется в эякуляте, хранившемся при 4 °С в течение 48 ч. При хранении эякулята при (25 или 37 °С ИФД значительно увеличивается уже после 1-х суток, а инкубация эякулята при 37 °С приводит к повышению ИФД уже после 1-го часа. Выявлены индивидуальные различия по степени увеличения ИФД под воздействием изучаемых температур инкубации эякулята. Хранение сперматозоидов при температуре 20 или 70 °С в нативном эякуляте либо в TNE-буфере не влияло на ИФД при измерении в течении 1–2 ч. Таким образом, хранение и транспортировка нативного эякулята при 4 °С в течение от 1 до 2 сут или в замороженном виде при температуре -20 или -70 °С могут быть рекомендованы для адекватной оценки уровня фрагментации ДНК сперматозоидов.

Ключевые слова: фрагментация ДНК сперматозоидов; мужская фертильность; хранения эякулята.

Для корреспонденции:

Татару Дарья Анатольевна, биолог-генетик, аспирант
Адрес: 660037, Красноярск, ул. Взлетная, 1/138
E-mail: tataru_dasha@inbox.ru

Tataru D.A.^{1,2}, Markova E.V.¹, Osadchuk L.V.², Sheina E.V.³, Svetlakov A.V.¹

THE OPTIMAL CONDITIONS OF STORAGE OF SPERMATOZOA FOR ANALYSIS OF DNA FRAGMENTATION

¹The Krasnoyarsk center of reproductive medicine, 660037 Krasnoyarsk, Russia; ²The institute of cytology and genetics of the Siberian branch of the Russian academy of sciences, 630090 Novosibirsk, Russia; ³The Novosibirsk center of reproductive medicine, 630037 Novosibirsk, Russia

The analysis of fragmentation of DNA of spermatozoons using technique of flow cytometry to evaluate male fertility more and more often begins to be applied in clinical diagnostic. However, development of optimal protocol of storage and preparation of spermatozoons for analysis still is at the stage of experimental elaboration. The study was carried out to analyze effect of different conditions of preparation of ejaculate for adequate evaluation of index of fragmentation of DNA of spermatozoons using sperm chromatin structure assay technique. The sampling consisted of 20 patients of the Krasnoyarsk center of reproductive medicine. The sperm chromatin structure assay technique was applied to evaluate index of fragmentation of DNA of spermatozoons in fresh native ejaculate and after storage of spermatozoons under different temperature (37, 25 and 4 0 C) and duration (1-2 and 1-3 days) and conditions of storage (-20 or -70 0C) of frozen spermatozoons (as native ejaculate or in TNE-buffer). It is demonstrated that index of fragmentation of DNA of spermatozoons has no significant alterations in ejaculate stored under 4 0C during 48 hours. In case of storage of ejaculate under 25 or 37 0C index of fragmentation of DNA of spermatozoons significantly increases already after first day of storage. The incubation of ejaculate under 37 0C results in increasing of index of fragmentation of DNA of spermatozoons already after first hour. The individual differences are established related to degree of increasing of index of fragmentation of DNA of spermatozoons because of impact of studied temperatures of ejaculate incubation. The storage of spermatozoons under temperature of -20 and -70 0C in native ejaculate or in TNE-buffer has no effect of index of fragmentation of DNA of spermatozoons with measurement during 1-2 hours. Therefore, storage and transportation of native ejaculate under 4 0C during 1-2 days or in frozen condition under temperature of -20 0C or -70 0C can be recommended for adequate evaluation of level of fragmentation of DNA of spermatozoons.

Key words: fragmentation of DNA of spermatozoons; male fertility; storage of ejaculate.

Исследование уровня фрагментации ДНК сперматозоидов – это новый метод оценки качества мужских половых клеток. Стандартное исследование эякулята направлено преимущественно на диагностику мужского фактора бесплодия, в то время как анализ фрагментации ДНК имеет дополнительное прогностическое значение для развития эмбриона.

Фрагментация ДНК – нарушение физической целостности молекулы ДНК в виде разрыва одной или обеих полинуклеотидных цепей [1]. Результаты многих исследований демонстрируют ассоциацию между высоким уровнем фрагментации ДНК сперматозоидов и сниженной фертильностью, а также эффективностью программ вспомогательных репродуктивных технологий (ВРТ) и повышением риска спонтанного прерывания беременности [2, 3].

В настоящее время разработано несколько подходов для оценки уровня фрагментации ДНК в сперматозоидах. Метод SCSA (sperm chromatin structure assay), разработанный D. Evenson [4], основан на измерении количества сперматозоидов, связанных с красителем акридиновым оранжевым, при рН-индуцированной денатурации. Благодаря метакроматическим свойствам акридинового оранжевого флюоресценция хроматина клеток становится зеленой или красной в зависимости от того, с какой молекулой ДНК – одноцепочечной или двухцепочечной связан краситель. Благодаря использованию проточной цитометрии для подсчета окрашенных клеток метод имеет важные преимущества, среди которых отметим возможность быстрого анализа большого количества клеток, автоматизированность и универсальность.

В последнее время метод SCSA для оценки уровня фрагментации ДНК в сперматозоидах получает все большее распространение как в исследовательских целях, так и в клинической диагностике, однако требуется разработка унифицированного методического протокола и уточнения референсных значений индекса фрагментации ДНК (ИФД) сперматозоидов. При подготовке эякулята к анализу фрагментации ДНК образец может подвергаться различным временным и температурным воздействиям, поэтому разработка оптимальных условий хранения и подготовки сперматозоидов для измерения ИФД является важной задачей, решение которой способствует получению объективных результатов. Так, ВОЗ для диагностических и исследовательских целей и проведения ВРТ рекомендовано хранение эякулята при температуре от 20 до 37 °С [5]. Однако влияние этих температурных условий на уровень фрагментации ДНК сперматозоидов не изучено.

Целью исследования стало изучение влияния различных условий подготовки эякулята для оценки ИФД сперматозоидов методом SCSA.

Материалы и методы. Исследование проводили на образцах эякулята от 20 мужчин (средний возраст 33,3 ± 3 года), проходивших обследование в Красноярском центре репродуктивной медицины с октября 2012 г. по май 2013 г. Сбор эякулята и определение концентрации сперматозоидов проводили согласно руководству ВОЗ по исследованию и обработке эякулята [5]. Уровень фрагментированной ДНК в сперматозоидах оценивали сразу после получения эякулята от пациента (в течение 10 мин) и после хранения сперматозоидов в различных условиях.

В первом эксперименте образцы нативного эякулята от 12 пациентов (№ 1–12) инкубировали при 37 °С в течение 1 или 2 ч (измерения были последовательными для каждого образца). Во втором эксперименте нативный эякулят от 4 мужчин (образцы № 13–16) инкубировали при температуре 4, 25 и 37 °С в течение 24, 48 и 72 ч. В третьем эксперименте эякулят от 4 мужчин (образцы № 17–20) замораживали и хранили при температуре -20 или -70 °С в виде нативного эякулята или в TNE-буфере (0,01 М трис; 1 мМ ЭДТА; 0,15 М NaCl pH 7,4) в концентрации 1 млн/мл. После 1 нед хранения все образцы подвергали быстрому размораживанию, после чего измеряли ИФД. Далее образцы хранили в холодильнике при 4 °С и ИФД измеряли спустя 1 или 2 ч (измерения были последовательными для каждого образца).

Уровень фрагментации ДНК в сперматозоидах измеряли цитофлюориметрическим методом SCSA с использованием красителя акридинового оранжевого [4] с модификациями [6]. Эякулят разводили TNE-буфером до концентрации сперматозоидов 1 млн/мл. К 100 мкл разведенных сперматозоидов добавляли 200 мкл кислотного буфера (0,1% тритон-X-100; 0,15 М NaCl; 0,08 н HCl; pH = 1,2). По истечении 30 с добавляли 600 мкл раствора акридинового оранжевого (6 мг/л в растворе 0,2 М гидрофосфата натрия; 1 мМ Na₂ ЭДТА; 0,15 М NaCl; 1 М лимонной кислоты; pH = 6). Количество сперматозоидов с зеленой (500–560 нм) и красной флюоресценцией (590–660 нм) определяли на проточном цитометре Guav Easy Cyte (Guava Millipore, США). В каждом образце анализировали 5000 клеток; все измерения осуществляли в трех повторностях. ИФН рассчитывали по формуле:

$$\text{ИФД} = \frac{N_{\text{крас.}}}{(N_{\text{крас.}} + N_{\text{зел.}})} \cdot 100\%,$$

где $N_{\text{крас.}}$ – количество сперматозоидов с красной флюоресценцией, $N_{\text{зел.}}$ – с зеленой.

Таблица 1

Уровень фрагментации ДНК в сперматозоидах после инкубации нативного эякулята при температуре 37°C в течение 1 или 2 ч

Номер образца	ИФД, %		
	До инкубации	Через 1 час	Через 2 часа
1-й	33,4	39,3	44,5
2-й	25,3	32,8	33,8
3-й	23,3	28,9	31,0
4-й	23,2	24,9	29,2
5-й	21,8	24,5	29,9
6-й	17,4	21,7	21,9
7-й	11,5	13,3	14,5
8-й	10,5	20,1	20,6
9-й	10,5	15,9	17,3
10-й	10,2	15,9	15,4
11-й	9,6	11,5	14,9
12-й	4,3	6,5	7,5

Примечание. Серой заливкой обозначены значения ИФД, относящиеся к категории высоких.

Согласно данным некоторых авторов, нормой принято считать ИФД ≤ 15%, к пограничным значениям относили 15% > ИФД ≥ 27%, к высоким – ИФД > 27% [7].

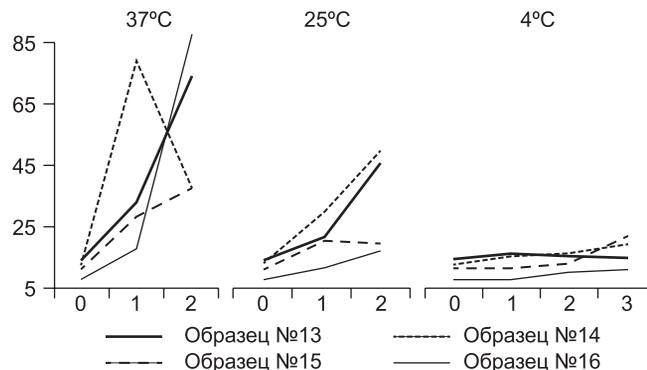
Достоверность различий оценивали по критерию Вилкоксона, используя пакет компьютерных программ STATISTICA, версия 6.0.

Результаты и обсуждение. Уровень фрагментации ДНК сперматозоидов в нативных образцах (n = 20), измеренный непосредственно после получения эякулята, варьировал от 4,3 до 54,1% (в среднем 17,3 ± 2,5%). В 11 образцах ИФД был низким, в 2 – высоким, в 7 – пограничным.

Результаты исследования ИФД после инкубации эякулята при 37 °С в течение 1 и 2 ч (n = 12) представлены в табл. 1. После 1-го часа инкубации наблюдали повышение ИФД во всех исследованных образцах на 1,9–9,6% (p = 0,002). При этом для 3 образцов произошел сдвиг ИФД из области низких значений в пограничные и для 2 – из пограничных в высокие. После 2-го часа ИФД увеличился на 3,0–11,1% от начального уровня (p = 0,004). 4 образца изначально с пограничными значениями ИФД перешли в группу с высокими значениями ИФД. После 2-часовой инкубации из 6 образцов с нормальными значениями ИФД только 2 остались в пределах нормы. Наши данные демонстрируют, что 1–2-часовое хранение эякулята при температуре 37 °С существенно повышает ИФД сперматозоидов.

Для исследования более широкого диапазона температурных условий хранения эякулята провели инкубацию образцов (n = 4) при 4, 25 и 37 °С в течение 1 и 2 сут. При инкубации эякулята при температуре 4 °С дополнительно анализировали эффекты инкубации в течение 3 сут. Результаты представлены на рисунке.

Все исследуемые образцы имели низкие начальные значения ИФД (среднее 11,6 ± 1,4%). Инкубация сперматозоидов при 37 °С приводила к резкому повышению ИФД во всех образцах. После 24 ч инкубации ИФД повысился на 10,4–66,1 %, причем 3 образца с нормальными исходными значениями перешли в категорию образцов с высокими значениями ИФД. После 48 ч инкубации ИФД был высоким во всех образцах (значения варьировали от 38,2 до 74%). Резкое увеличение ИФД после 24 и 48 ч инкубации наблюдали во всех образцах, за исключением образца № 2, в котором произошло наиболее резкое увеличение (в 6 раз) ИФД после 1-х суток инкубации с последующим снижением на 2-е



Изменения (в %) ИФД сперматозоидов при хранении эякулята от 1 до 3 сут при температуре 4, 25 и 37°C.

По горизонтали – время инкубации (в сут).

сутки. Таким образом, ИФД после инкубации эякулята при 37 °С в течение суток значительно увеличивается.

При хранении эякулята при комнатной температуре 25 °С в течение 24 ч ИФД повысился во всех образцах на 3,6–16% и сместился в область пограничных и высоких значений в 3 образцах из 4. На 2-е сутки ИФД составил от 17 до 49,8%, и, соответственно, все образцы с изначально нормальными значениями ИФД характеризовались пограничными или высокими значениями. В результате исследования влияния комнатной температуры на ИФД можно заключить, что данные условия способствуют росту ИФД в сперматозоидах, хотя и в меньшей степени по сравнению с таковым при температуре 37 °С.

Значения ИФД при инкубации эякулята при 4 °С, представленные на рисунке, показывают, что после 24 ч инкубации уровень фрагментации повышается во всех образцах, но в меньшей степени, чем при инкубации при 37 и 25 °С. Изменение показателя составило 0,2–2%. Тем не менее образцы пациентов № 13 и № 14 из группы с низким ИФД (14,3 и 13,2%) перешли в группу с пограничными значениями ИФД (15,7 и 15,2%). После 48-часовой инкубации зафиксировали увеличение ИФД во всех образцах на 1,8–3,2% от начального уровня, однако ИФД для всех образцов остался в тех же пределах, что и после 1-х суток инкубации. После 72-часовой инкубации ИФД также увеличился на 2,4–5,8%, за исключением 1 образца. После 3-х суток 3 образца из 4 попали в область так называемой серой зоны (пограничные значения). Таким образом, инкубация эякулята при 4 °С по сравнению с таковой при других исследованных температурных условиях

Таблица 2

Уровень фрагментации ДНК в сперматозоидах после хранения эякулята при -20 или -70 °С в течение 7 сут

Показатель	Номер образца	ИФД, %			
		до замораживания	после замораживания -20 °С/-70 °С		
			сразу	через 1 ч	через 2 ч
Нативный эякулят	17	8,2	8,1/8,1	7,5/8,4	8,8/7,2
	18	16,2	14,7/14,0	15,4/15,8	19,9/19,7
	19	19,1	20,1/18,8	19,2/18,2	21,9/19,1
	20	54,2	51,4/53,6	60,8/49,6	57,8/61,2
Сперматозоиды в TNE-буфере	17	8,2	7,6/7,4	7,3/7,3	7,2/7,4
	18	16,2	18,3/14,4	20,4/14,7	20,8/17,6
	19	19,1	19,8/20,7	21,4/18,8	19,8/20,7
	20	54,2	53,9/53,2	52,3/52,1	63,7/59,6

приводит к наименьшему отклонению ИФД от начального, особенно во временном интервале 1–2 сут.

В третьем эксперименте мы анализировали ИФД после хранения сперматозоидов в замороженном виде при -20 или -70 °С как в нативном эякуляте, так и в TNE-буфере (табл. 2). Отметим, что 1 образец характеризовался высоким начальным значением ИФД, 2 образца – пограничными, а оставшийся – низким. Сразу после размораживания сперматозоидов ИФД либо не изменялся, либо незначительно повышался как в нативном эякуляте, так и в буфере независимо от температуры хранения. Максимальное повышение ИФД составило 2,1%. Спустя 1 или 2 ч после размораживания сперматозоидов ИФД повышался незначительно при условии их помещения в холодильник (4 °С).

Хранение сперматозоидов в виде нативного эякулята или в TNE-буфере при -20 или -70 °С также не вносило существенных различий в исследуемый параметр. Значения ИФД в рамках этого эксперимента демонстрируют, что ИФД для каждого конкретного образца остался в пределах исходных.

В результате проведенных исследований обнаружили, что температура 37 °С оказывает наиболее неблагоприятное влияние на ИФД сперматозоидов человека, что проявляется уже через 1 ч и выражается в существенном повышении ИФД. Таким образом, анализ уровня фрагментации ДНК сперматозоидов, проведенный в таких условиях, может дать ошибочные, а именно ложноположительные результаты. Рекомендованный ВОЗ порядок работы с эякулятом при 37 °С для проведения стандартного спермиологического анализа [5] неприемлем для анализа уровня фрагментации ДНК, так как может исказить данный показатель. Из представленных нами данных можно заключить, что если эякулят был оставлен при температуре 25 или 37 °С более чем на 1 сут, образцы можно считать не пригодными для измерения уровня фрагментации ДНК в сперматозоидах.

Исходя из полученных данных, лучшими условиями для адекватной оценки уровня фрагментации ДНК в сперматозоидах можно рекомендовать хранение эякулята при 4 °С длительностью не более 2 сут либо хранение в замороженном виде при температуре -20 или -70 °С с последующим измерением ИФД в течение 1 ч после размораживания. В условиях работы спермиологической лаборатории для оценки ИФД сперматозоидов предлагается использовать аликваты эякулята. Кроме того, при транспортировке образцов эякулята могут применяться охлаждение до 4 °С или заморозка.

Результаты анализа полученных данных показывают, что для разных пациентов наблюдается изменчивость в степени увеличения ИФД при хранении эякулята, причем на основании наших данных не представляется возможным вывести какой-либо поправочный коэффициент к ИФД, если не соблюдаются рекомендованные условия хранения. Степень изменения уровня ИФД носит индивидуальный характер, ее невозможно прогнозировать исходя из начального значения. Наши данные согласуются с результатами, полученными другими авторами [8], которые показали, что образцы спермы от разных пациентов демонстрируют различную степень изменения уровня фрагментации ДНК. При хранении эякулята вне холодильника существует высокая вероятность того, что в любом образце эякулята, даже с низким значением ИФД, около 50% сперматозоидов будут содержать поврежденную ДНК [8]. Межлабораторные сравнения ИФД затруднительны, поскольку нет единых требований к обеспечению пробоподготовки. Варьирование преаналитического этапа от лаборатории к лаборатории делает показатели ИФД несопоставимыми.

Следует учитывать, что при соблюдении оптимальных условий хранения возможно незначительное повышение ИФД, и пограничные значения, вероятно, следует интерпретировать как вариант нормы. В то же время для адекватной интерпретации пограничных значений ИФД (так называемой серой зоны) необходимы дополнительные исследования. Возможно, дополнительные исследования требуются для

подтверждения предлагаемых нормативных значений ИФД, которые различаются у разных авторов [9, 10].

Несмотря на большое количество исследований, посвященных анализу уровня фрагментации ДНК в сперматозоидах человека и роли этого параметра в оценке мужской фертильности и результативности ВРТ, работ, посвященных внутри- и межиндивидуальному варьированию этого показателя и влиянию лабораторных факторов на ИФД не очень много. По нашим данным, помещение образца эякулята в условия 37 °С имеет крайне негативные последствия для целостности ДНК в сперматозоидах, что важно не только для лабораторного анализа ИФД, но и для исхода программы ЭКО, что описано многими авторами [1–14].

Заключение. Полученные данные демонстрируют, что хранение и транспортировка нативного эякулята при 4 °С в течение от 1 до 2 сут или в замороженном виде при температуре -20 или -70 °С могут быть рекомендованы в клинической диагностике для адекватной оценки фрагментации ДНК сперматозоидов.

ЛИТЕРАТУРА

1. Божедомов В. А., Виноградов И. В., Липатова Н. А., Спорши Е. А., Рохликов И. М. Нарушения структуры хроматина сперматозоидов: клиническое значение, причины, диагностика, лечение (обзор литературы). Проблемы репродукции. 2012; 5: 80–8.
2. Simon L., Lutton D., McManus J., Lewis S. E. Sperm DNA damage measured by the alkaline Comet assay as an independent predictor of male infertility and in vitro fertilization success. *Fertil Steril.* 2011; 95: (2): 652–7.
3. Robinson L., Gallos I. D., Conner S. J., Rajkhowa M., Miller D., Lewis S., Kirkman-Brown J., et al. The effect of sperm DNA fragmentation on miscarriage rates: a systematic review and meta-analysis. *Hum. Reprod.* 2012; 27: (10): 2908–17.
4. Evenson D. P., Jost L. K., Marshall D., Zinaman M. J., Clegg E., Purvis K., et al. Utility of the sperm chromatin structure assay as a diagnostic and prognostic tool in the human fertility clinic. *Hum. Reprod.* 1999; 14: 1039–49.
5. Руководство ВОЗ по исследованию и обработке эякулята человека. Пятое издание. Всемирная организация здравоохранения, Медико-генетический научный центр РАМН (перевод на русский язык), 2012: 291 с.
6. Шеина Ю. И., Зайцева Т. А., Махалова Н. А., Новосельцева А. В., Маркова Е. В., Светланов А. В. Анализ фрагментации ДНК в сперматозоидах с помощью окраски акридиновым оранжевым у пациентов с бесплодием. Проблемы репродукции. 2012; 5: 74–80.
7. Larson K. L., DeJonge C. J., Barnes A. M., Jost L. K., Evenson D. P. Sperm chromatin structure assay parameters as predictors of failed pregnancy following assisted reproductive techniques. *Hum. Reprod.* 2000; 15: 1717–22.
8. Gosalvez J., Cortes-Gutierrez E., Lopez-Fernandez C., Fernandez J. L., Caballero P., Nunez R. Sperm deoxyribonucleic acid fragmentation dynamics in fertile donors. *Fertil. Steril.* 2009; 92: (1): 170–3.
9. Bungum M., Humaidan P., Axmon A., Spano M., Bungum L., Erenpreiss J., et al. Sperm DNA integrity assessment in prediction of assisted reproduction technology outcome. *Hum. Reprod.* 2007; 22: 174–9.
10. Lewis S., Aitken J., Conner S., Iulius G., Evenson D., Henkel R. et al. The impact of sperm DNA damage in assisted conception and beyond: recent advances in diagnosis and treatment. *Reprod. Biomed. Online.* 2013; 27: 325–37.
11. Bungum M., Humaidan P., Spano M., Jepson K., Bungum L., Givercman A. The predictive value of sperm chromatin structure assay (SCSA) parameters for the outcome of intrauterine insemination, IVF and ICSI. *Hum. Reprod.* 2004; 19: 1401–8.
12. Collins J. A., Barnhart K. T., Schlegel P. N. Do sperm DNA integrity tests predict pregnancy with in vitro fertilization? *Fertil Steril.* 2008; 89: 823–31.
13. Simon L., Castillo J., Oliva R., Lewis S. E. Relationships between human sperm protamines, DNA damage and assisted reproduction outcomes. *Reprod. Biomed. Online.* 2011; 23: (6): 724–34.
14. Zini A., Boman J., Belzile E., Ciampi A. Sperm DNA damage is as-

sociated with an increased risk of pregnancy loss after IVF and ICSI: systematic review and metaanalysis. Hum. Reprod. 2008; 23: (12): 2663–8.

REFERENCES

1. Bozhedomov V. A., Vinogradov I. V., Lipatova N. A., Sporish E. A., Rokhlikov I. M. Violations of sperm chromatin structure: clinical significance, causes, diagnosis, treatment (review). Problemy reproduktivnoy. 2012; 5: 80–8. (in Russian)
2. Simon L., Lutton D., McManus J., Lewis S. E. Sperm DNA damage measured by the alkaline Comet assay as an independent predictor of male infertility and in vitro fertilization success. Fertil. Steril. 2011; 95: (2): 652–7.
3. Robinson L., Gallos I. D., Conner S. J., Rajkhowa M., Miller D., Lewis S., Kirkman-Brown J., et al. The effect of sperm DNA fragmentation on miscarriage rates: a systematic review and metaanalysis. Hum. Reprod. 2012; 27: (10): 2908–17.
4. Evenson D. P., Jost L. K., Marshall D., Zinaman M. J., Clegg E., Purvis K., et al. Utility of the sperm chromatin structure assay as a diagnostic and prognostic tool in the human fertility clinic. Hum. Reprod. 1999; 14: 1039–49.
5. WHO guidelines for research and treatment of human ejaculate. Fifth Edition. World Health Organization, Medical Genetics Research Center (Russian translation), 2012: 291s. (in Russian)
6. Sheina Yu. I., Zaytseva T. A., Makhalova N. A., Novosel tseva A. V., Markova E. V., Svetlakov A. V. Analysis of DNA fragmentation in the sperm were stained with acridine orange in patients with infertility. Problemy reproduktivnoy. 2012; 5: 74–80. (in Russian)
7. Larson K. L., DeJonge C. J., Barnes A. M., Jost L. K., Evenson D. P. Sperm chromatin structure assay parameters as predictors of failed pregnancy following assisted reproductive techniques. Hum. Reprod. 2000; 15: 1717–22.
8. Gosalvez J., Cortes-Gutierrez E., Lopez-Fernandez C., Fernandez J. L., Caballero P., Nunez R. Sperm deoxyribonucleic acid fragmentation dynamics in fertile donors. Fertil. Steril. 2009; 92: (1): 170–3.
9. Bungum M., Humaidan P., Axmon A., Spano M., Bungum L., Erenpreiss J., et al. Sperm DNA integrity assessment in prediction of assisted reproduction technology outcome. Hum. Reprod. 2007; 22: 174–9.
10. Lewis S., Aitken J., Conner S., Iulius G., Evenson D., Henkel R. et al. The impact of sperm DNA damage in assisted conception and beyond: recent advances in diagnosis and treatment. Reprod. BioMed. Online. 2013; 27: 325–37.
11. Bungum M., Humaidan P., Spano M., Jepson K., Bungum L., Givercman A. The predictive value of sperm chromatin structure assay (SCSA) parameters for the outcome of intrauterine insemination, IVF and ICSI. Hum. Reprod. 2004; 19: 1401–8.
12. Collins J. A., Barnhart K. T., Schlegel P. N. Do sperm DNA integrity tests predict pregnancy with in vitro fertilization? Fertil. Steril. 2008; 89: 823–31.
13. Simon L., Castillo J., Oliva R., Lewis S. E. Relationships between human sperm protamines, DNA damage and assisted reproduction outcomes. Reprod. Biomed. Online. 2011; 23: (6): 724–34.
14. Zini A., Boman J., Belzile E., Ciampi A. Sperm DNA damage is associated with an increased risk of pregnancy loss after IVF and ICSI: systematic review and metaanalysis. Hum. Reprod. 2008; 23: (12): 2663–8.

Поступила 06.09.14
Received 06.09.14

МИКРОБИОЛОГИЯ

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2015

УДК 618.15/16-002.828:577.2.083

Савочкина Ю. А., Румянцева Т. А., Долгова Т. И., Гуцин А. Е.

РАЗРАБОТКА МЕТОДИКИ НА ОСНОВЕ КОЛИЧЕСТВЕННОЙ МУЛЬТИПЛЕКСНОЙ ПЦР ДЛЯ ДИАГНОСТИКИ ВУЛЬВОВАГИНАЛЬНОГО КАНДИДОЗА

ФБУН «ЦНИИ эпидемиологии» Роспотребнадзора, 111123, г. Москва

Разработана методика (и соответствующий набор реагентов «АмплиСенс® Флороценоз/Кандиды-FL»), предназначенная для лабораторной диагностики вульвовагинального кандидоза. Методика основана на ПЦР в режиме реального времени и позволяет идентифицировать и количественно определять содержание в биологическом материале пяти наиболее распространенных возбудителей кандидоза: *Candida albicans*, *C. glabrata*, *C. krusei*, *C. parapsilosis* и *C. tropicalis*. Проведено экспериментальное определение аналитических характеристик разработанной методики. Аналитическая чувствительность составила 100 ГЭ/мл (геномных эквивалентов в 1 мл), линейный диапазон – от 200 до $2 \cdot 10^7$ ГЭ/мл для каждого из выявляемых видов *Candida*.

Сравнение количественных результатов определения содержания *Candida spp.* с помощью разработанной методики с результатами посева показало их соответствие друг другу, для результатов в логарифмическом представлении коэффициент соотношения $\lg[\text{ГЭ/мл}]$ к $\lg[\text{КОЕ/мл}]$ составил 1,2. Корреляция результатов характеризовалась коэффициентом R^2 , равным 0,76.

Ключевые слова: вульвовагинальный кандидоз, *Candida spp.*; *Candida albicans*, *Candida glabrata*, *Candida krusei*, *Candida parapsilosis*, *Candida tropicalis*; количественный ПЦР-анализ; ПЦР в режиме реального времени.

Для корреспонденции:

Савочкина Юлия Анатольевна, канд. биол. наук, ст. науч. сотр. лаб. мол. диагностики и эпидемиологии инфекций органов репродукции
Адрес: 111123, Москва, ул. Новогиреевская, 3а
E-mail: savochkina@pcr.ru