

НОВЫЙ ВЗГЛЯД ИЗ КЛИНИЧЕСКОЙ И ФАРМАЦЕВТИЧЕСКОЙ ПРАКТИКИ

Novel insight from clinical and pharmaceutical practice

Научная статья

УДК 616-71

DOI: 10.14489/lcmp.2023.03.pp.047-066

ТЕХНОЛОГИЧЕСКОЕ РЕШЕНИЕ ДЛЯ ОЦЕНКИ АКТИВНЫХ ФОРМ КИСЛОРОДА И ДИСПЕРСИИ ХРОМАТИНА СПЕРМАТОЗОИДОВ: АДАПТАЦИЯ РЕКОМЕНДАЦИЙ ЛАБОРАТОРНОГО РУКОВОДСТВА ВОЗ (2021) К ПРАКТИКЕ МЕДИЦИНСКИХ ЛАБОРАТОРИЙ РОССИИ

Ж. Ю. Давидова

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

Подольский диагностический центр, клиничко-диагностическая лаборатория, Подольск, Россия

Согласно лабораторному руководству Всемирной организации здравоохранения (ВОЗ) по исследованию и обработке спермы человека, 6-е издание (2021 г.) [1], существует ряд методов измерения уровней активных форм кислорода (АФК), фрагментации ДНК сперматозоидов (ДФС) и его индекса (DFI/DNA fragmentation index) в сперме, каждому из них присущи свои ограничения. Ввиду простоты исполнения не только в лабораторных условиях, но и местах оказания медицинской помощи (point-of-care/POC), мировым профессиональным сообществом отмечены два метода измерения АФК и ДФС как наиболее надежные: определение общей антиоксидантной способности спермы (ОС) и Гало-тест (Halo test/SCD /Sperm chromatin dispersion). Впервые в России были созданы два Набора реагентов (далее Набор): «ОксиСперм (NBT-тест)» (Россия) по методике с нитросиним тетразолием (NBT-тест/Tetrazolium Nitroblue) для измерения АФК и Гало-тест (SCD) «ГалоСперм» для оценки дисперсии хроматина сперматозоидов или ФДНКС. Оба Набора показали не только воспроизводимые результаты по сравнению с ВОЗ (2021), но и технологические преимущества по сравнению с описанными ВОЗ методами. В настоящей публикации представлены пошаговые инструкции по эксплуатации новых российских Наборов.

Ключевые слова: мужское бесплодие, фрагментация ДНК, АФК, ДФС, NBT-тест, Гало-тест, ОксиСперм, Компания Лайф энд Кволити.

Для цитирования: Давидова Ж. Ю. Технологическое решение для оценки активных форм кислорода и дисперсии хроматина сперматозоидов: адаптация рекомендаций лабораторного руководства ВОЗ (2021) к практике медицинских лабораторий России // Лабораторная и клиническая медицина. Фармация. 2023. Т. 3, № 3. С. 47 – 66. DOI: 10.14489/lcmp.2023.03.pp.047-066

Research Article

KIT DESIGNING FOR ASSESSING ROS AND SCD IN SEMEN: REPLICATION OF METHODOLOGY WHO LABORATORY MANUAL (2021) IN TO RUSSIAN LABORATORY PRACTICE

Davidova Zh.Yu.

International Cytology School & Innovatory Medical School, Moscow, Russia

Podolsk Diagnostic Center, Medical Laboratory, Podolsk, Russia

According to WHO laboratory manual for the examination and processing of human semen, sixth edition (2021) [1], there are a number of techniques available to measure ROS (Reactive Oxygen Species) and DFI levels in semen and each of them has its inherent limitations. According to WHO (2021), two methods for measuring ROS and DFI seems to be attractive due to reliability and simplifying of performance not only in laboratory conditions but also in point-of-care (POC) one. Russian technique utilizes Tetrazolium Nitroblue for measuring ROS which kit named 'OxySperm (NBT-assay)' and SCD-assay named 'HaloSperm' have been replicated and upgrade methods compared to WHO (2021) and another fundamental scientific papers. Both kits showed not only reproducible results compared with WHO (2021) but also have technological advantages over the previous described methods. This publication presents step-by-step operational procedures of novel Russian kits.

Keywords: Male Factor Infertility, ROS, DFI, NBT-assay, SCD-assay, OxySperm, LLC Life&Quality Company.

For citation: Davidova ZhYu. Kit Designing for assessing ROS and SCD in Semen: Replication of Methodology WHO Laboratory Manual (2021) in to Russian Laboratory Practice. *Laboratory and Clinical Medicine. Pharmacy*. 2023;3(3):47-66. (In Russ). DOI: 10.14489/lcmp.2023.03.pp.047-066

Введение

Руководство ВОЗ (2021) рекомендует проводить дополнительное исследование спермы с помощью тестов для выявления ОС или АФК (Глава 3 «Продвинутые исследования») и тестов ДФС (Глава «Расширенные исследования») [1].

В руководстве ВОЗ представлены методики для проведения этих лабораторных исследований, а также перечень используемых химических реагентов, которые в настоящее время не используются в лабораторной практике российских медицинских лабораторий. На сегодняшний день в России отсутствуют коммерчески доступные Наборы, разрешенные к использованию в клинической практике (отсутствует регистрационное удостоверение (РУ)). Создавшаяся ситуация представляет широкие возможности для исследований и клинических разработок ученым, практикующим специалистам лабораторной медицины, компаниям-производителям реагентов для диагностики *in vitro*.

В 2022–2023 гг под руководством научного идеолога и разработчика лабораторных реагентов Международной Школы Цитологии и Медицинской Школы Инноваций (далее МШЦ&МШИ) и производителя российских реагентов на базе департамента научно-исследовательской лаборатории клинических разработок МШЦ&МШИ были созданы и апробированы Наборы для оценки репродуктивного здоровья мужчины: «ГалоСперм» для оценки дисперсии ДНК-фрагментов сперматозоидов и «ОксиСперм (NBT-тест)» для определения АФК в сперме взрослого мужчины (оценка ОС эякулята). Российские разработки основывались на рекомендациях руководства ВОЗ (2021) [1], но, как показала практика, информации было либо недостаточно, либо состав химических реагентов

представлял потенциальную угрозу здоровью персонала, либо рекомендуемый процесс проведения тестов был многоступенчатый и трудоемкий, что обусловило необходимость модификации методик и воссоздания Наборов, адаптированных к российским условиям.

В настоящей статье представлены и подробно описаны инструкции к проведению исследований с помощью Наборов отечественного производства, которые в настоящее время проходят регистрационные испытания, а также проводится параллель с рекомендуемыми методиками руководства ВОЗ (2021) [1].

ОксиСперм(NBT-тест) vs методики ВОЗ (2021)

Гипотеза о том, что дисбаланс окислительно-восстановительных реакций в МДПЖ (мужских добавочных половых железах) может отрицательно сказываться на фертильности, выдвигалась десятилетиями [2–6]. Общеизвестно, что АФК, продуцируемые лейкоцитами, лежат в основе их вредного воздействия, если концентрация в сперме превышает пороговые значения [7,8]. 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 (пероксидазо-позитивных клеток) <1 млн/мл (ниже порогового значения) [9–12].

Однако до сих пор в мире не было проведено исследования с убедительными доказательствами в пользу определенного теста или доказательства взаимосвязи между окислительно-восстановительными процессами и результатами спонтанного или искусственного зачатия. Тем не менее, общепризнано, что ОС, вероятно, является важным модулятором функции сперматозоидов человека и результатов успешного оплодотворения [13].

Поскольку одним из последствий ОС является повреждение ДНК сперматозоидов, что является наиболее часто измеряемым маркером мужской фертильности, существует несколько других методов исследования, которые можно использовать для непосредственного изучения баланса антиоксидантов и АФК. С точки зрения клинической диагностики, эту группу анализов следует использовать и интерпретировать с осторожностью только до тех пор, пока не будет получено более убедительное доказательство их клинической значимости.

Процедуры, представленные в рекомендациях лабораторного руководства ВОЗ (2021), широко использовались в андрологических исследованиях, а также в некоторых андрологических клинικο-диагностических лабораториях (КДЛ) и лабораториях вспомогательных репродуктивных технологий (ВРТ) [1].

Несмотря на то, что лабораторные тесты, которые могут быть использованы для оценки ОС или АФК, различаются как по методу, так и по типу АФК, которые они обнаруживают, существуют единые показания для их использования: прегравидарная подготовка супружеской пары без ВРТ; супружеские пары, планирующие зачатие в непродуктивном возрасте; идиопатическое бесплодие супружеской пары на протяжении шести месяцев и более; потеря беременности (выкидыши, замершая беременность); прегравидарная подготовка для ВРТ; неуспешные циклы ЭКО (плохое качество эмбриона во время второго цикла донатии яйцеклетки); перед программой ВМИ (внутриматочной инсеминации); возраст мужчины старше 40 лет; мужчины с нормальными параметрами спермограммы (нормальными показателями подвижности, концентрации, жизнеспособностью и морфологией сперматозоидов), но с неудачными попытками зачатия, а также выкидышами и замершей беременностью у супруг; мужчины, которые носят тесное нижнее белье; мужчины, планирующие зачатие после химиотерапии; мужчины, планирующие зачатие с тяжелыми сопутствующими заболеваниями; мужчины с вредными привычками (курение, злоупотребление алкоголем, переедание, малоподвижный образ жизни); мужчины с урогенитальными инфекциями; мужчины с варикоцеле; мужчины, у которых в анамнезе рак; идиопатическое мужское бесплодие.

Руководство ВОЗ рекомендует три метода — люминолзависимой хемилюминесценции, измерение окислительно-восстановительного потенциала (REDOX) и оценка общей оксидантной способности спермы.

Метод люминолзависимой хемилюминесценции основан на хемилюминесцентной реакции люминола при вступлении в реакцию со свободным радикалом с последующим измерением результата с помощью люминометра и расчета количества относительных световых единиц на миллион сперматозоидов. Отмечено, что люминометры, как правило, не аккредитованы для диагностики *in vitro*, они предназначены только для научных исследований. Конструкция приборов (например, объем пробы) и, как следствие, калибровка, чувствительность, динамический диапазон и даже используемые единицы измерения сильно различаются. В этой связи из-за описанных различий между приборами и методологиями и низкой прогностической ценности конечного результата не существует согласованных контрольных значений.

Многие факторы влияют на итоговый сигнал, поэтому результаты очень чувствительны к обращению с образцом и времени измерения.

Метод люминолзависимой хемилюминесценции чувствителен к pH, изменениям температуры и воздействию химических веществ, которые часто варьируются в зависимости от свойств эякулята, таких как аскорбиновая кислота (снижает сигнал) или тиолсодержащие молекулы (повышают результаты), а также к уровням других присутствующих белков. В соответствии с этим, метод не предназначен для рутинных исследований в лабораторной практике.

REDOX-метод основан на прямом измерении окислительно-восстановительного баланса эякулята электрохимическим способом. В настоящее время метод является предметом многочисленных исследований в области бесплодия, так как требует минимальных манипуляций и, следовательно, вполне поддающийся стандартизации. Проблема широкомасштабного внедрения метода в практику в том, что отсутствует опубликованная убедительная доказательная база для этого метода, поэтому настоящее время он по-прежнему рассматривается как исследовательский тест. К тому же вязкость пробы и плохое разжижение могут затруднить прохождение пробы и, следовательно, заполнение контрольной камеры.

Оценка общей оксидантной способности предназначена для получения информации о компенсаторной возможности эякулята нейтрализовать любой ОС. Таким образом, это измерение способности антиоксидантных ферментов и систем в семенной плазме, а также любых антиоксидантов, полученных из пищевых или иных

веществ, которые попадают в семенную плазму (но не в сперматозоиды, так как они удаляются центрифугированием). В ходе анализа присутствующие антиоксиданты ингибируют окисление ABTS (2'-азинобис-3-этилбензтиазолинсульфокислоты) катионом-радикалом. Метод был разработан для многих биологических жидкостей организма и не специфичен для спермы [14]; основан на колориметрии и предназначен для оценки результатов на соответствующем анализаторе.

Процедура проведения метода наряду с веществами, которые могут влиять на результаты анализа, широко описаны в научно-практической литературе и имеет обширную доказательную базу [1,15].

Как было отмечено выше, существует ряд методов для измерения АФК в сперме, и каждому из них присущи свои ограничения [16]. Российские ученые и производители реагентов для лабораторной медицины создали доступный в исполнении метод измерения внутри- и внеклеточного АФК на поверхности мембраны сперматозоидов [1,17], который представляет собой бесприборную диагностику с помощью Набора «ОксиСперм» (NBT-тест), основанный на визуальной оценке результатов согласно цветовой оценочной шкале, соответствующей уровню АФК. Проект рабочей инструкции, разработанный и апробированный на исследовательских образцах спермы, обеспечивает минимальное время оборота теста (TAT/turnaround time), максимальную безопасность персонала и простоту исполнения. Одноступенчатость теста представляет высокие преимущества по сравнению с методиками, описанными

в руководстве ВОЗ (2021), что делает возможным его применение не только в условиях КДЛ, но и в кабинете врача (point-of-care testing/РОСТ).

Проект инструкции Набора «ОксиСперм» (NBT-тест)

Назначение. Набор используется для определения АФК в сперме взрослого мужчины.

Принцип тестирования. Супероксид-ионы АФК сперматозоидов обладают высокой реакционной способностью, которая может быть восстановлена с помощью NBT-реагента (нитросиний тетразолий) до синего формазана. Цвет формазана положительно коррелирует с содержанием O_2 в сперме.

Состав. Набор представлен в двух комплектациях – комплект 1 и 2 на 20 и 50 определений соответственно. Основной реагент – это микропробирка с микрогелем, куда необходимо внести образец эякулята.

Условия и продолжительность хранения.

Набор хранится при температуре от 4 до 25 °С в темном месте в течение 12 месяцев.

Не использовать набор после истечения срока годности.

Оборудование и материалы (требуемые, но не включенные в Набор).

– Контейнеры для размещения и транспортировки пробы эякулята.

– Одноразовые латексные перчатки.

– Поверенные микропипетки на 1...5 мкл, 20...200 мкл, 100...1000 мкл и одноразовые накопечники к ним.

– Холодильник фармацевтический на +2...+8 °С.

– Водяная баня или термостат с постоянной температурой 37 °С.

– Сухожаровый шкаф или водяная баня на +80...+100 °С.

– Вытяжной шкаф.

Требования к образцам эякулята.

– Образец должен быть собран путем мастурбации или полового контакта после 48-ми часов воздержания.

– Если образец высокой вязкости или плохо разжижается, следует провести химическое разжижение с помощью разжижающего раствора 1:1. Рекомендуются использовать реагент для разжижения.

Таблица 1 / Table 1

Основной состав «ОксиСперм» (NBT-тест)

Main compositions of kit OxySperm (NBT-assay)

№	Спецификация/Specification	Комплект 1/ Set 1	Комплект 2/ Set 2
1	Микропробирки 0,5 мл с микрогелем и NBT-реагентом (реакционная ячейка)/ microtubes 0.5 ml with gel low melting point and NBT	20 шт	50 шт
2	Плавающая ячейка с отверстиями для микропробирок/ Float	1 шт	2 шт
3	30% H_2O_2 для положительного контроля, 10 мл/ 30% H_2O_2 for positive control 10 ml	1 шт	1 шт

– Образец должен быть свежим, без крио-консервации.

– Если образец не может быть протестирован вовремя, допускается кратковременное хранение свежей спермы в закрытом одноразовом контейнере при температуре 2...8 °C в течение 6...8 часов.

Процесс проведения анализа.

1. Приготовление реагента.

Перед проведением анализа реакционную ячейку необходимо разместить в сухожаровый шкаф или водяную баню на +80...+100 °C до полного разжижения геля. Затем перенести реакционную ячейку в водяную баню или термостат при 37 °C на пять минут для стабилизации температуры.

Цвет микрогеля должен быть беловато-желтоватый. Если цвет микрогеля темно-желтый, значит реагент потерял эффективность.

2. Подготовка образца.

Добавить в реакционную ячейку 100 мкл эякулята. Во избежание дополнительного стресса сперматозоидов образец эякулята аккуратно размешать наконечником дозатора без образования пузырьков, смешать с микрогелем реакционной ячейки, выдержать 1–2 мин.

3. Инкубация.

Вставить реакционную ячейку в отверстие плавающего планшета при 37 °C на водяную баню (в условиях КДЛ) или разместить ячейку в термостат при 37 °C (в условиях РОСТ) на 30 мин.

4. Оценка результата.

Оценить результат невооруженным глазом.

Результат основывается на интенсивности цвета согласно цветовой шкале, а уровень АФК относится к идентификационным критериям теста.

Референсные результаты. Отрицательно (–); слабо-положительно (+); положительно (++); резко-положительно (+++).

Показатель эффективности продукта – отрицательный (–) холостой тест, то есть реакционная ячейка с микрогелем без добавления эякулята не дает окрашивания, соответствующего цветовой шкале.

Ограничения метода. Концентрация сперматозоидов <2 млн/мл, криптозооспермия, азооспермия.

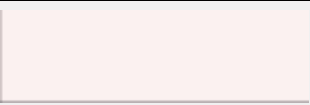
Отрицательный контроль. Цвет расплавленного при +80...+100 °C микрогеля и доведенного до комнатной температуры 22 °C без добавления эякулята – беловато-желтоватый.

Положительный тест. Цвет расплавленного при +80...+100 °C микрогеля с добавлением 200 мкл 30 % H₂O₂ и выдержанного при температуре 37 °C 30 мин – от светло-сиреневого до темно-сиреневого.

Методические рекомендации руководства ВОЗ (2021) и концепция разработанных операционных процедур первого российского технологического решения «ОксиСперм» (NBT-тест) совпадают по принципу определения общей антиоксидантной способности эякулята, описанного в ВОЗ (2021) в Главе «Продвинутые исследования» [1]. Различия состоят только в применении разных химических реагентов для проведения реакции (ABTS и NBT-реагент) и в способе конечной

Таблица 2 / Table 2

Цветовая шкала оценки уровня АФК
Colour scale for scoring ROS level

Интерпретация результата/ Result identification	Цвет/ Colour	Цветовая кодировка/ Colour Code
Норма(–)/ Normal (Negative)	Беловато-желтоваты/ светло-розовый	
Низкий уровень АФК(+)/ Low level of ROS (+)	Светло-сиреневый	
Средний уровень АФК(++)/ Moderate level of ROS (++)	Сиреневый	
Высокий уровень АФК (+++)/ High level of ROS (+++)	Темно-сиреневый	

оценки результатов (приборная и визуальная оценки). Важно подчеркнуть, что операционные процедуры отечественного Набора простые и занимают в общей сложности около 40 мин. Технологические испытания Набора показали бесприборное получение информативных результатов анализа как в условиях КДЛ, так и в условиях РОСТ, что отражено на рис. 1.

Набор «ГалоСперм» (Россия) vs методики ВОЗ (2021)

Повреждение ДНК сперматозоидов можно определить как любое химическое изменение в нормальной структуре ДНК. Среди этих изменений ДФС в виде одноцепочечных или двухцепочечных разрывов является одним из наиболее распространенных нарушений, влияющих на генетический ма-

териал. ДФС может быть вызвана различными процессами, включая дефектную упаковку ДНК во время сперматогенеза, а также процессы гибели клеток и окислительного стресса, которые могут быть связаны с несколькими патологическими состояниями и условиями окружающей среды [18–20].

Несмотря на то, что способность к оплодотворению сперматозоидов, содержащих дефектную (фрагментированную ДНК), может и не нарушаться, многочисленные мета-анализы, опубликованные в последние годы, указывают на то, что ДФС может повлиять на развитие эмбриона, имплантацию и беременность как при спонтанном оплодотворении, так и при ДФС [21–24].

Также известно, что ДФС распространена среди мужчин с аномальными параметрами эякулята, но было высказано предположение, что это связано со случаями бесплодия у лиц с нормозооспермией. Поскольку ДФС лишь частично связана с качеством спермы [18,25], она может стать важным дополнением в лечении мужского бесплодия, предоставив возможность лечащему врачу один из наиболее обсуждаемых и многообещающих биомаркеров в фундаментальной и клинической андрологии.

Было разработано несколько методов определения ДФС. Представленные здесь методы широко использовались в течение последних 20 лет в лабораториях андрологии и ВРТ. Анализ, который может быть использован для оценки ДФС, различается как по методу, так и по типу обнаруживаемых повреждений. Идентификация фрагментов поврежденных ДНК (одиночный или двойной разрыв), меченных dUTP с помощью терминальной дезокси-нуклеотидил-трансферазы (TUNEL/nick-end labeling of dUTP using terminal deoxynucleotidyl transferase) и электрофорез в одноклеточном геле (Comet assay) непосредственно оценивают наличие одноцепочечных и/или двухцепочечных разрывов в ДНК, в то время как проточная цитометрия с акридиновым оранжевым (AO FCM/Acridine orange flow cytometry) и тест на дисперсию хроматина сперматозоидов (SCD/Sperm chromatin dispersion test) или так называемый Гало-тест (Halo assay) определяют восприимчивость хроматина к обработке кислотой [1]. В настоящее время не определен «золотой стандарт» измерения ДФС и его оптимальные пороговые значения, однако, в руководстве ВОЗ (2021) приводятся вышеперечисленные тесты, которые кажутся надежными для получения информации о качестве ДНК сперматозоидов, что важно для установления мужского фактора бесплодия [1]. Пороговые значения этих методов будут специфичны для каждо-



Рис. 1. Визуальная оценка результатов теста «ОксиСперм» (NBT-тест) согласно цветовой шкале

Fig. 1. Scoring by OxySperm (NBT-assay) according to the colour scale

го анализа и метода, с помощью которых они проводились. Для клинического применения соответствующие пороговые значения должны быть установлены и подтверждены референсной лабораторией. Для оценки диагностической значимости для каждого пациента важно, чтобы изучались не только популяционные корреляции; данные о прогностической ценности положительных и отрицательных результатов необходимы для подтверждения полезности этих тестов в реальной клинической практике.

Метод *TUNEL* является еще одним из наиболее распространенных методов оценки фрагментации ДНК сперматозоидов. Анализ основан на обнаружении разрывов цепей ДНК *in situ* путем их маркировки флуорохромами или зондами, меченными биотином, которые используются со стрептавидин-HRP (пероксидазой хрена) и хромогенным субстратом HRP. Принцип метода заключается в маркировке разрывов, присутствующих в ДНК, дезоксинуклеотидами (обычно дезоксиуридинтрифосфатом/dUTP), которые, в свою очередь, могут быть непосредственно конъюгированы с флуоресцентным красителем или помечены биотином.

Метод может быть выполнен несколькими способами. В мире существуют коммерческие наборы, которые содержат меченые зонды и фермент TDT, необходимый для связывания зонда с разрывами ДНК. После маркировки процентное содержание сперматозоидов можно определить с помощью флуоресцентной микроскопии или проточного цитометра. В случае зондов, меченных биотином, для выявления меченых сперматозоидов необходимы пероксидаза хрена и хромогенный субстрат HRP. Клетки, окрашенные этим методом, можно визуализировать микроскопически, однако, для высокопроизводительной оценки клинических образцов спермы *TUNEL* можно использовать в сочетании с проточной цитометрией, с помощью которой возможна количественная оценка доли генетически скомпрометированных клеток в образце спермы.

Comet assay (CA) – метод оценки ДФС в отдельных сперматозоидах, основанный на дифференциальной миграции разорванных нитей ДНК под воздействием электрического поля в зависимости от заряда и размера нитей [26,27]. Название теста связано с появлением «кометы» окрашенных размотанных фрагментов ДНК при просмотре под флуоресцентным микроскопом, которые отделяются от головки сперматозоида после электрофоретического перемещения. Сперматозоиды

помещают в тонкую агарозную матрицу, где в условиях высокого содержания соли стимулируется лизис, вызванный детергентом. Эта обработка удаляет ядерные белки, позволяя образовывать нуклеоидоподобные структуры, которые в щелочных условиях позволяют двухцепочной ДНК внутри нуклеоидов разматываться. Во время последующей стадии электрофореза разорванные нити ДНК мигрируют к аноду, создавая характерный дисперсионный рисунок, напоминающий хвост кометы. Неповрежденная ДНК составляет головную часть «кометы», в то время как фрагментированные штаммы ДНК составляют хвост «кометы». Относительная флуоресценция этого последнего элемента по сравнению с головкой служит показателем уровня повреждения ДНК [28]. Подсчет «комет» может быть произведен визуально или с помощью программного обеспечения для подсчета баллов [29,30]. На каждый дублирующийся слайд должно быть набрано не менее 50 «комет». Также в мире, за исключением России, доступны коммерческие наборы и программное обеспечение для СА. В нескольких исследованиях сообщалось о диагностических порогах ДФС при оценке с использованием анализа СА. Пороговые значения сильно отличаются друг от друга и зависят от условий, при которых проводится анализ и исследуемого фенотипа [31–33]. Поскольку СА включает в себя множество методологических этапов, требует высокого уровня знаний для интерпретации результатов и имеет значительный уровень межлабораторных вариаций, его использование может оказаться неподходящим для некоторых лабораторий.

Метод *AO FCM* основан на уникальном свойстве акридинового оранжевого (АО) излучать зеленую флуоресценцию, когда он вставляется между двухцепочечной ДНК, и красную флуоресценцию, когда он связан с одноцепочечной ДНК. Текущая версия, описанная Эвенсоном [34], может быть использована для оценки свежих и/или замороженных образцов и включает в себя только два основных методологических этапа. На первом этапе сперматозоиды обрабатывают раствором детергента с низким pH (1,2), чтобы денатурировать их хроматин и обеспечить его последующее окрашивание; на втором этапе суспензию сперматозоидов нейтрализуют, и клетки окрашивают вторым раствором, содержащим АО. Данные о красной и зеленой флуоресценции собираются методом проточной цитометрии и преобразуются для определения степени красной флуоресценции в популяции сперматозоидов, известной как DFI.

Анализ собранных данных может быть выполнен с помощью любого программного обеспечения для проточной цитометрии. Также в мире, кроме России, доступны коммерческие наборы реагентов и программное обеспечение к ним. В нескольких исследованиях сообщалось о диагностических порогах DFI, измеренных методом проточной цитометрии с использованием АО [35,36], но каждая отдельная лаборатория должна определять свои референсные интервалы согласно обследуемой популяции.

SCD/Halo assay на дисперсию хроматина сперматозоидов, основан на световой микроскопии для оценки восприимчивости ДНК сперматозоидов к кислотной денатурации. SCD основан на принципе, согласно которому неповрежденные петли ДНК расплетаются после денатурации и экстракции ядерных белков, тогда как при ДФС дисперсия не развивается или является минимальной. Этот метод основан на способности интактного хроматина сперматозоидов образовывать дисперсионные ореолы после воздействия кислоты и лизирующего раствора; ореолы соответствуют расплетенным петлям ДНК, прикрепленным к остаточной ядерной структуре, которые высвобождаются после удаления ядерных белков. Разрывы ДНК, поскольку они подвержены денатурации, предотвращают это рассеивание. Метод состоит из трех основных этапов:

1) встраивание сперматозоидов в агарозную матрицу, которая обеспечивает инертный субстрат, подобный суспензии, для манипулирования клетками;

2) инкубация в кислотном растворе для разматывания ДНК с последующим лизированием; кислотный раствор действует как денатурат ДНК, который растворяет двойную спираль ДНК только в присутствии повреждения ДНК, а лизирующий раствор используется для удаления ядерных белков;

3) промывка и обезвоживание в этаноле с возрастающей концентрацией и окрашивание для визуализации под световым микроскопом [37,38].

Тест SCD также в мире, за исключением России, доступен в виде коммерческих наборов, которые содержат все необходимые реагенты для анализа, что обеспечивает простоту его применения и технической эксплуатации, а также позволяет получать воспроизводимые результаты в различных КДЛ. Результаты классифицируют в соответствии с критериями Фернандеса и др. [39], оценивая дисперсионный ореол (гало):

1) большой: ширина ореола равна или больше малого диаметра сердцевины;

2) средний: размер ореола находится между размерами с большим и с маленьким ореолом;

3) маленький: ширина ореола равна или меньше одной трети малого диаметра сердцевины;

4) без ореола;

5) без ореола-разрушенные: т.е. те, у которых нет ореола, и сердцевина неравномерно или слабо окрашена. Эта категория связана с серьезными повреждениями, затрагивающими как ДНК, так и белковые соединения.

Необходимо исследовать препарат под световым микроскопом и иммерсионным объективом $\times 100$. Подсчет на 500 сперматозоидов на каждый препарат рекомендовано. Результаты должны быть представлены в процентах от каждой категории. Процент сперматозоидов с фрагментированной ДНК равен сумме сперматозоидов с маленьким ореолом, без ореола и без ореола-разрушенных.

На тему SCD опубликован ряд небольших исследований, направленных на изучение его клинического применения [39–59], но каждая отдельная КДЛ должна определять свои референсные интервалы согласно обследуемой популяции.

Российские ученые и производители реагентов для лабораторной медицины разработали и создали отечественный Гало-тест (SCD) для оценки дисперсии ДНК-фрагментов сперматозоидов в улучшенном варианте исполнения. Пошаговая инструкция российского технологического решения «ГалоСперм» представлена в настоящей публикации.

Проект инструкции Набора «ГалоСперм» (Россия)

Назначение. Набор предназначен для оценки целостности ДНК сперматозоидов в эякуляте человека или других млекопитающих.

Принцип тестирования. Свежий образец эякулята с концентрацией 5 – 10 млн/мл наносится на предметное стекло в инертный микрогель. Первоначальная обработка раствором, который денатурирует ДНК клеток сперматозоидов, приводит к фрагментации ДНК. Затем проводится обработка раствором, который разрушает большинство белков ядра.

Интактные (неповрежденные/нефрагментированные) молекулы ДНК расширяются после денатурации и экстракции ядерных белков с образованием нуклеол с большими специфическими ореолами (гало) расплетенных петель ДНК, которые выходят из центрального ядра.

При фрагментации ДНК дисперсия не развивается или минимальна и сопровождается образованием нуклеол без ореола рассеивания, либо ореол (гало) слабо выражен.

Состав. Набор содержит все необходимое для технологического процесса теста в условиях КДЛ (табл. 3). Реагент № 1 предназначен для разведения эякулята до концентрации 5 – 10 млн/мл; Реагент № 2 необходим для денатурации и экстракции ядерных белков; Реагент № 3 – для удаления ядерных белков; Реагенты № 4 – 6 – для окрашивания и оценки результатов под световым микроскопом. Входящие в состав Набора слайд-баррели с плотно закрывающимися крышками предназначены для размещения Реагентов № 1 – 6. Стекла предметные предподготовленные с микрогелем предназначены для встраивания сперматозоидов в агарозную матрицу, которая обеспечивает инертный субстрат, подобный суспензии, для манипулирования клетками. Микропробирки типа Эппендорф 0,5 мл с микрогелем (реакционные ячейки) предназначены для размещения эякулята, концентрация которого от 5 – 10 млн/мл. Плавающая ячейка с отверстиями для микропробирок облегчает размещение реакционных ячеек на водяной бане.

Формат набора «ГалоСперм»: комплект 1 – на 20 определений и комплект 2 – на 50 определений.

Условия и продолжительность хранения.

Набор хранится при температуре от +4 до +25 °С в темном месте в течение 12 месяцев. После получения Набор необходимо поместить в темное место при температуре +4...+22 °С. Перед использованием все реагенты набора довести до комнатной температуры (22 °С). После вскрытия Набор рекомендовано хранить в темном месте при температуре +2...+8 °С. Дата использования набора отмечена на упаковке. Не использовать набор по истечению срока годности.

Оборудование и материалы (требуемые, но не включенные в Набор).

Вода дистиллированная, светлополюсный микроскоп, счетчик форменных элементов, холодильник фармацевтический на + 2...+8 °С, морозильник на –20 °С, водяная баня или термостат с постоянной температурой 37 °С, сушижаровый шкаф или водяная баня на +80...+100 °С, низкоскоростная центрифуга, вытяжной шкаф, контейнеры для размещения и транспортировки пробы эякулята, одноразовые латексные перчатки, покровные стекла (22×22 мм), поверенные микропипетки на 1...5 мкл, 20...200 мкл, 100...1000 мкл и одноразовые наконечники к ним, пипетки Пастера, пробирки полипропиленовые для образца эякулята, бумага фильтровальная, алюминиевый/пластиковый лоток.

Таблица 3 / Table 3

Основной состав «ГалоСперм»
Main compositions of kit HaloSperm

№	Состав/ Main compositions	Комплект 1/ Set 1	Комплект 2/ Set 2
1	Реагент № 1/Reagent 1	20 мл	50 мл
2	Реагент № 2/Reagent 2	50 мл	100 мл
3	Реагент № 3/Reagent 3	50 мл	100 мл
4	Реагент № 4/Reagent 4	50 мл	100 мл
5	Реагент № 5/Reagent 5	50 мл	100 мл
6	Реагент № 6/Reagent 6	50 мл	100 мл
7	Слайд-баррель на 2 стекла/Slide barrel for 2 slides	5 шт	5 шт
8	Стекла предметные предподготовленные с микрогелем/ Pre-coated slides	1 бокс (20 шт/в боксе)	1 бокс (50 шт/в боксе)
9	Микропробирки типа Эппендорф 0,5 мл с микрогелем (реакционные ячейки)/ Microtubes 0.5 ml with gel low melting point	20 шт	50 шт
10	Плавающая ячейка с отверстиями для микропробирок/ Float	1 шт	2 шт

Требования к образцам эякулята.

– Образец должен быть собран путем мастурбации или полового контакта после 48-ми часов воздержания.

– Образец должен быть свежим, без криоконсервации.

– Образец должен быть доставлен в медицинскую лабораторию немедленно.

Подготовка пробы к анализу.

Образец эякулята должен быть разжижен и хорошо перемешан без образования пены и пузырьков воздуха. Оптимальное время выполнения теста для получения точного результата – в интервале между 30...60 минутами после сбора спермы.

Если образец высокой вязкости или плохо разжижается, следует провести химическое разжижение с помощью разжижающего раствора 1:1. Рекомендуется использовать реагент для разжижения.

ВАЖНО! При подготовке образца эякулята к исследованию (согласно п. 3.2 процесса проведения анализа) необходимо учитывать разведение.

Процесс проведения анализа.

1. Разместить промаркированную пробирку с разжиженным образцом эякулята (с ID образца) на рабочий стол

2. Довести все реагенты Набора до комнатной температуры (22 °C) Перед использованием хорошо перемешать, так как может образоваться осадок.

3. Подготовить образцы эякулята:

3.1. Подсчитать концентрацию сперматозоидов в образце эякулята в мл/мл.

3.2. Образец спермы необходимо развести Реагентом №1 до концентрации 5 – 10 млн/мл. Не допускать чрезмерного загустевания раствора.

4. Подготовить микрогель:

4.1. Поместить реакционную ячейку в плавающую ячейку в кипящую водяную баню, погрузив его до уровня крышки; оставить в воде на пять минут при температуре +80...+100 °C, пока микрогель не расплавится, предварительно убедившись либо переворачиванием ячейки на бок, либо аспирацией аликвоты расплавленного микрогеля с помощью наконечника и дозатора.

4.2. Переместить реакционную ячейку в водяную баню-термостат на 37 °C на пять минут.

4.3. Добавить в реакционную ячейку 60 мкл образца эякулята, подготовленного в п. 3.2.

4.4. Хорошо перемешать и довести до температуры 37 °C.

5. Подготовить слайд-препараты:

5.1. В предварительно охлажденный до +2...+8 °C в течение пяти минут алюми-

ний/пластиковый лоток поместить горизонтально подготовленное предметное стекло с микрогелем (входит в состав набора) рабочей поверхностью вверх.

5.2. На предметное стекло, находящееся в охлажденном лотке, поместить аликвоту суспензии эякулята из реакционной ячейки, подготовленную в п. 4.3–4.4 в количестве 60 мкл и, избегая образования пузырьков воздуха, накрыть покровным стеклом размером 22×22 мм. Если жидкость не распределяется равномерно до краев покровного стекла, аккуратно нажать на него кончиком микропипетки.

5.3. Поместить предварительно охлажденный алюминиевый/пластиковый лоток с приготовленным препаратом в холодильник и оставить при температуре +2...+8 °C в течение пяти минут, пока не застынет суспензия под покровным стеклом.

5.4. Удалить покровное стекло, аккуратно его сдвинув и не повредив препарат.

6. Денатурация Реагентом № 2:

6.1. Немедленно разместить предметное стекло с препаратом, подготовленным в п. 5.4, в вертикальном положении в слайд-баррель с Реагентом № 2 до полного покрытия стекла.

6.2. Оставить препарат на 7 минут при комнатной температуре (+22 °C) для инкубации.

6.3. Достать пинцетом слайд-препарат из Реагента № 2.

6.4. Промокнуть стекающие капли фильтровальной бумагой.

7. Лизис Реагентом № 3:

7.1. Разместить предметное стекло с препаратом, подготовленным в п. 6.4, в вертикальном положении в слайд-баррель с Реагентом № 3 до полного покрытия стекла.

7.2. Оставить препарат на 25 минут при комнатной температуре (22 °C) для инкубации.

7.3. Достать пинцетом слайд-препарат из Реагента № 3.

7.4. Промокнуть стекающие капли фильтровальной бумагой.

8. Промывка дистиллированной водой:

8.1. Разместить предметное стекло с препаратом, подготовленным в п. 7.4, в горизонтальном положении в лоток, налить на стекло 8 – 10 мл дистиллированной воды, чтобы стекло было полностью покрыто водой.

8.2. Оставить препарат на пять минут при комнатной температуре (+22 °C) для инкубации и полного удаления следов Реагента № 3.

8.3. Достать пинцетом слайд-препарат из дистиллированной воды.

8.4. Промокнуть стекающие капли фильтровальной бумагой.

9. Окрашивание препарата:

9.1. Разместить предметное стекло с препаратом, подготовленным в п. 8.4, в слайд-баррель с Реагентом № 4, чтобы стекло было полностью покрыто Реагентом № 4 на 4–5 минут.

9.2. Достать пинцетом слайд-препарат из Реагента № 4.

9.3. Разместить предметное стекло с препаратом, подготовленным в п. 9.2, в слайд-баррель с Реагентом № 5, чтобы стекло было полностью покрыто Реагентом № 5 на одну минуту.

9.4. Достать пинцетом слайд-препарат из Реагента № 5.

9.5. Разместить предметное стекло с препаратом, подготовленным в п. 9.4, в слайд-баррель с Реагентом № 6, чтобы стекло было полностью покрыто Реагентом № 6 на две минуты.

9.6. Достать пинцетом слайд-препарат из Реагента № 6.

9.7. Погрузить предметное стекло с препаратом в вертикальном положении в контейнер с дистиллированной водой так, чтобы стекло было полностью покрыто водой, для полного удаления следов Реагента № 6.

9.8. Немедленно достать пинцетом слайд-препарат из дистиллированной воды.

9.9. Промокнуть стекающие капли фильтровальной бумагой и высушить препарат на воздухе. Препарат готов для микроскопии.

10. Микроскопия препарата:

10.1. Исследовать от 200...500 (500 рекомендовано ВОЗ, 6-е издание, 2021 г) сперматозоидов в образце подготовленного для исследования эякулята с помощью светооптического микроскопа на иммерсионном объективе $\times 100$.

10.2. Гало сперматозоидов в исследуемом препарате классифицировать по пяти категориям согласно критериям Fernández, et al. [39].

1. **ФРАГМЕНТАЦИЯ ДНК ОТСУТСТВУЕТ – ОПТИМАЛЬНОЕ КАЧЕСТВО ЭЯКУЛЯТА** – нет разрывов/повреждения ядерной ДНК сперматозоидов.

Микроскопическая картина препарата: сперматозоиды с большим гало (Large/L) (сперматозоид, размер гало которого больше или такой же, как внутренний диаметр ядра) (рис. 3).

2. **ФРАГМЕНТАЦИЯ ДНК ПРИСУТСТВУЕТ, НО БЕЗ ЗНАЧИМОГО ВЛИЯНИЯ НА ЭМБРИОГЕНЕЗ** – некоторые разрывы/повреждения ядерной ДНК сперматозоидов.

Микроскопическая картина препарата: сперматозоиды с гало среднего размера (Medium/M) (сперматозоид с гало, размер которого меньше большого гало и больше малого гало сперматозоида) (рис. 2, 4).

3. **ФРАГМЕНТАЦИЯ ДНК ПРИСУТСТВУЕТ, СУБОПТИМАЛЬНОЕ КАЧЕСТВО ЭЯКУЛЯТА** – значимые разрывы/повреждения ядерной ДНК сперматозоидов.

Микроскопическая картина препарата: сперматозоид с малым гало (Small/S) (сперматозоид, размер ореола которого меньше 1/3 или такой же, как внутренний диаметр ядра) (рис. 4 – 6).

4. **ФРАГМЕНТАЦИЯ ДНК ПРИСУТСТВУЕТ, НЕОПТИМАЛЬНОЕ КАЧЕСТВО ЭЯКУЛЯТА** – значимые разрывы/повреждения ядерной ДНК сперматозоидов.

Микроскопическая картина препарата: сперматозоид без гало (Without HALO /WH) (рис. 4, 6).

5. **ФРАГМЕНТАЦИЯ ДНК ПРИСУТСТВУЕТ, ЭЯКУЛЯТ НИЗКОГО КАЧЕСТВА** – полная деградация ядерной ДНК сперматозоидов.

Микроскопическая картина препарата: разрушенный сперматозоид без гало (Without HALO -Degraded/WHd) (сперматозоид без ореола и с ядром, которое неравномерно или слабо окрашено) (рис. 5, 6).

10.3. Подсчитать процентное содержание сперматозоидов с фрагментированным ДНК согласно следующей формуле:

$$DFI = \frac{S + WH + WHd}{N} 100 \%,$$

где DFI – индекс фрагментации ДНК сперматозоидов; S – число *сперматозоидов с малым гало*; WH – число *сперматозоидов без гало*; WHd – число *разрушенных сперматозоидов без гало*; N – число исследуемых сперматозоидов.

10.4. Записать результаты анализа на отчете пациента согласно следующим категориям:

- Число исследуемых сперматозоидов (N), %.
- Число сперматозоидов без фрагментации ДНК (L + M), %.
- Число сперматозоидов без фрагментации ДНК (L + M), %.
- Число сперматозоидов с фрагментацией ДНК (S + WH), %.
- Число разрушенных/деградированных сперматозоидов (WHd), %.
- Индекс фрагментации ДНК сперматозоидов (DFI), %.

Интерпретация результатов тестирования:

1. Процент сперматозоидов с фрагментированной ДНК будет выше, если не соблюдены условия доставки и хранения образца спермы до начала проведения анализа (риск ложноположительных результатов).

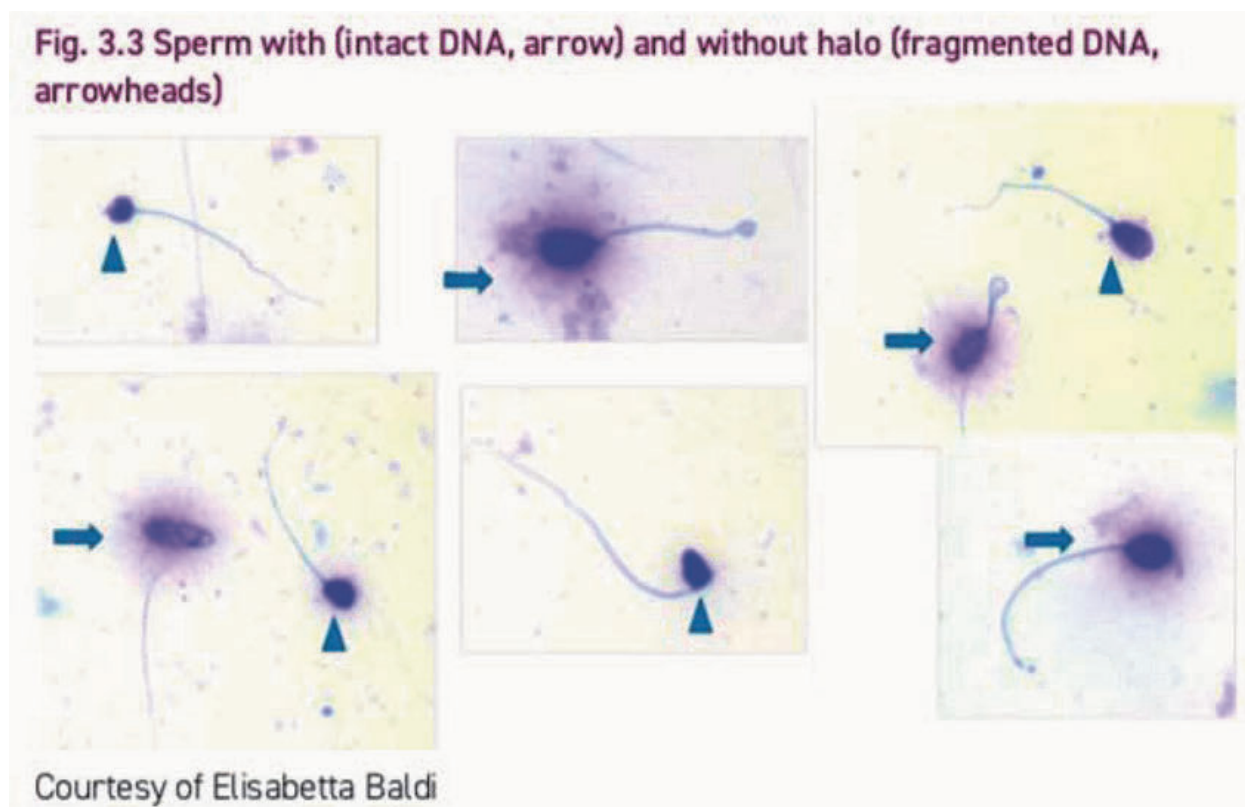


Рис. 2. Микроскопическая картина результатов Гало-теста согласно методике руководства ВОЗ по исследованию и обработке эякулята человека. 6-е издание, 2021, стр. 98. Окраска по Райту. x400.
Сперматозоиды без фрагментации ДНК помечены стрелками.

Сперматозоиды с фрагментированной ДНК помечены треугольниками

Fig. 2. Microscopic pictures of SDC according WHO laboratory manual for the examination and processing of human semen. Sixth Edition. 2021. p.98. Wright Stain x400.

Sperm with intact DNA noted arrow. Sperm with fragmented DNA noted arrowheads

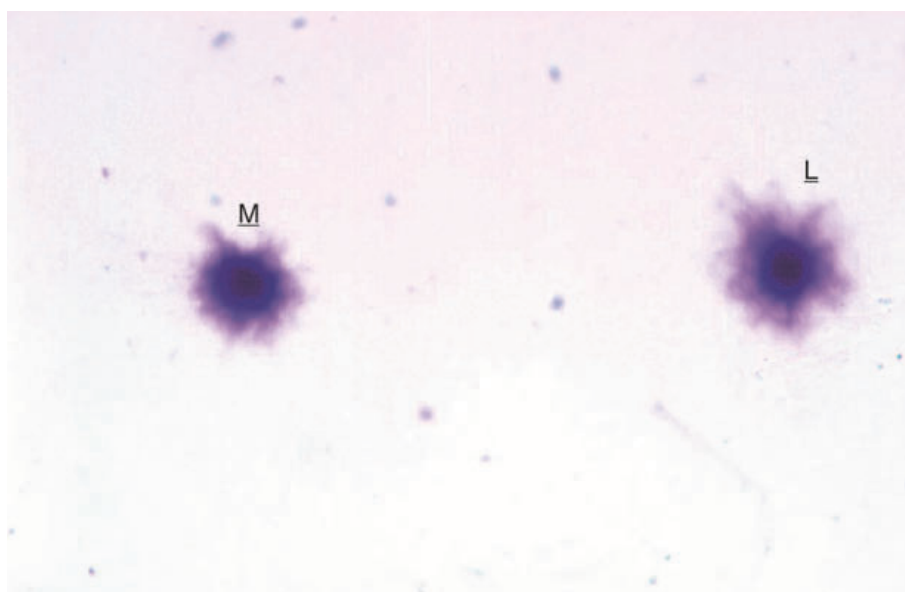


Рис. 3. Микроскопические находки SCD-теста «ГалоСперм». Май-Грюнвальд-Гимзе (МГГ). x1000

М – сперматозоиды с гало среднего размера; L – сперматозоиды с большим гало

Fig. 3. Microscopic findings of SDC-test from HaloSperm Giemsa-Romanovsky stain (MGG). x1000

M – medium halo size of spermatozoa; L – large halo size of spermatozoa

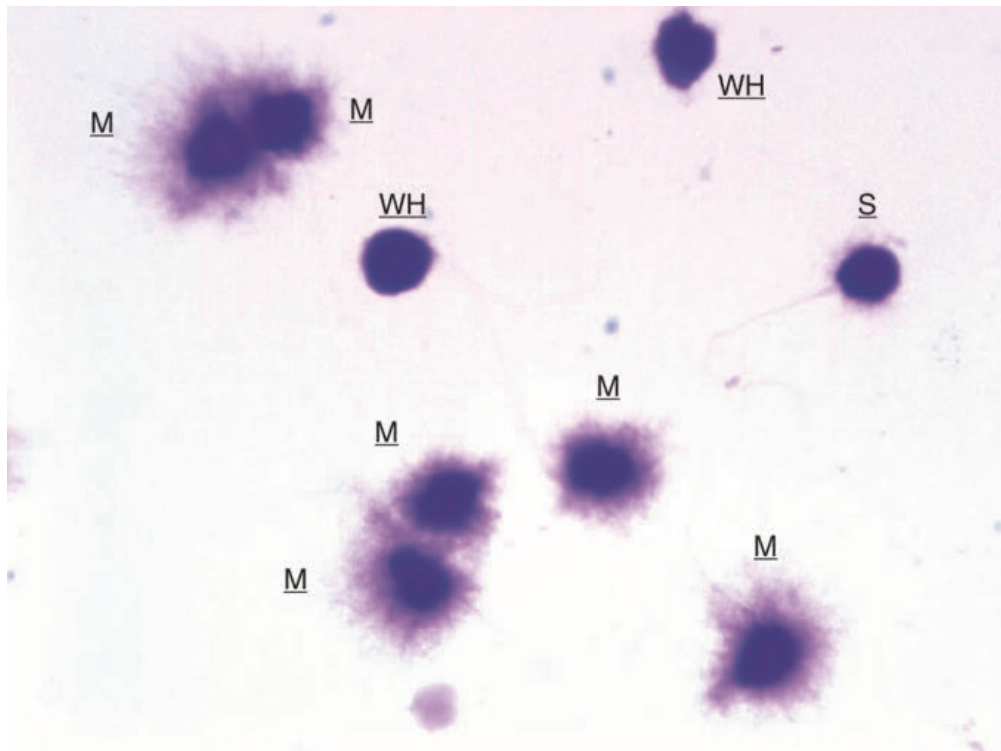


Рис. 4. Микроскопические находки SCD-теста «ГалоСперм». МГГ. ×1000

M – сперматозоиды с гало среднего размера; S – сперматозоиды с малым гало; WH – сперматозоиды без гало

Fig. 4. Microscopic findings of SCD-test from HaloSperm. MGG. ×1000

M – medium halo size of spermatozoa; S – small halo size of spermatozoa; WH – spermatozoa without halo

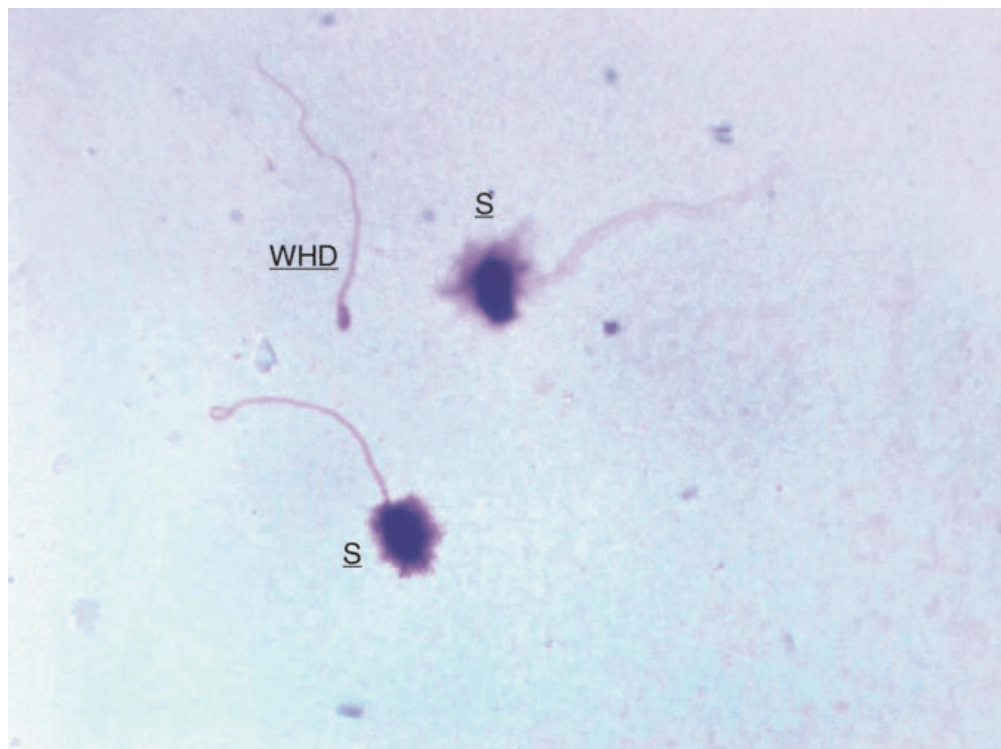


Рис. 5. Микроскопические находки SCD-теста «ГалоСперм». МГГ. ×1000

S – сперматозоиды с малым гало; WHD – разрушенные сперматозоиды без гало

Fig. 5. Microscopic findings of SCD-test from HaloSperm. MGG. ×1000

S – small halo size of spermatozoa; WHD – spermatozoa without halo-degraded

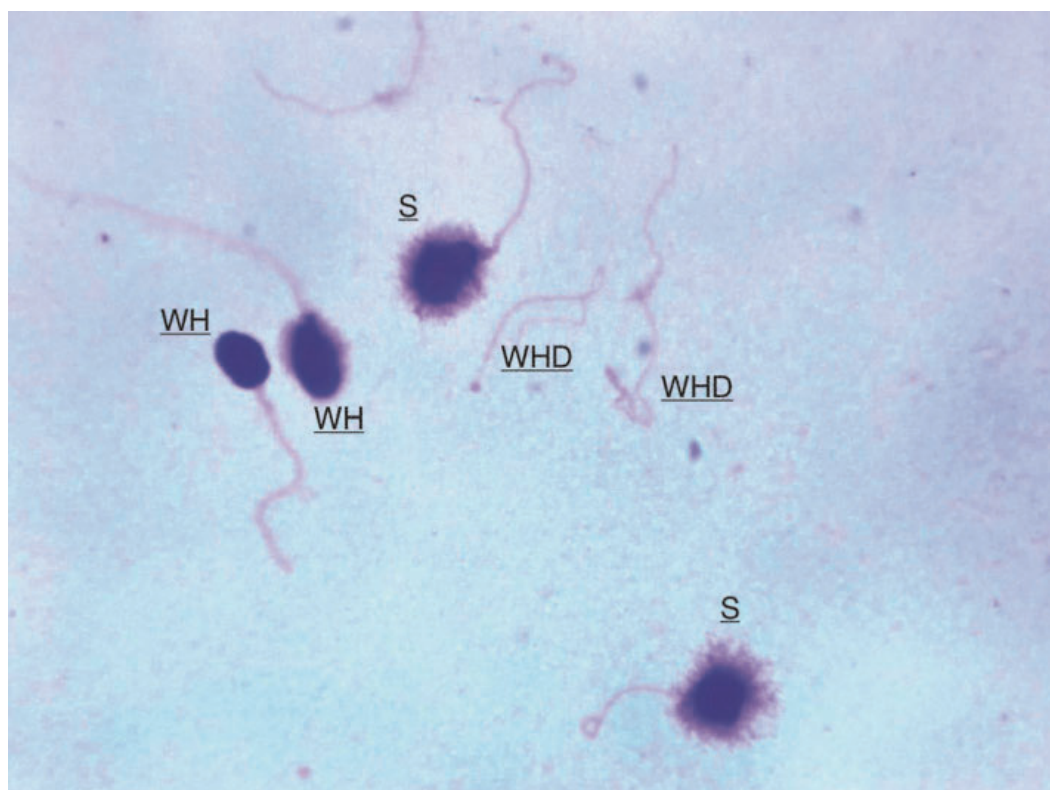


Рис. 6. Микроскопические находки SCD-теста «ГалоСперм». МГГ. ×1000

S – сперматозоиды с малым гало; WH – сперматозоиды без гало; WHD – разрушенные сперматозоиды без гало

Fig. 6. Microscopic findings of SCD-test from HaloSperm. MGG. ×1000

S – small halo size of spermatozoa; WH – spermatozoa without halo; WHD – spermatozoa without halo-degraded

2. Процент сперматозоидов с фрагментированной ДНК будет ниже, если время реакции с раствором А или В будет превышено (риск ложноотрицательных результатов).

3. Если ореолы дисперсии ДНК (гало) могут наблюдаться во всех сперматозоидах в одной группе образцов спермы или наоборот, необходимо усомниться в достоверности результатов и повторить тест еще раз.

10.4. Предварительно оценить результат лабораторного анализа согласно пороговым значениям:

Норма: $DFI \leq 15 \%$.

Сомнительный результат: $DFI > 15 \%$, но $< 25 \%$.

Патология: $DFI > 25 \%$.

ВАЖНО! В настоящее время в мире не существует единых референтных значений. Результаты некоторых научных исследований результатов SCD показывают процент сперматозоидов с фрагментированной ДНК $12,31 \pm 6,31$ (~25 %), в которых сперматозоиды получены от 98 фертильных мужчин без каких-либо нарушений [39,42–44].

Ограничения. Набор предназначен только для ручного исполнения.

Предостережения.

1. Температуру в помещении следует отрегулировать до 20...25 °С, чтобы сохранить надежность и стабильность реакционной системы (оптимальная температура 22 °С).

2. Не допускать испарения и загрязнения реагентов во время работы. Реагенты № 2 – № 6 можно использовать повторно от трех до пяти раз.

3. Реагенты не смешиваются друг с другом.

4. От использованных реагентов следует отказаться после их использования в течение некоторого времени. Вышеуказанные реагенты после вскрытия их флаконов и размещения их в слайд-баррели можно хранить в этих же слайд-баррелях при температуре 2...8 °С до истечения рекомендуемого в п. 2 срока.

5. После денатурации в сперме произойдут значительные изменения во всех видах клеток. Очень трудно отличить нормальные клетки от сперматозоидов, теряющих хвосты. Если размер клетки в образце спермы большой и без хвостика, не рассматривайте ее как сперматозоид и не подсчитывайте.

6. Если все ореолы слишком маленькие и их цвет слишком бледный, возможно, это связано с отсутствием достаточного окрашивания или не-

годностью Реагентов № 4 – № 6. Пожалуйста, перекрасьте или используйте новую окраску, перелив ее из флаконов в соответствующие слайд-баррели.

7. Если трудно отличить головку сперматозоида от ореола, это может быть результатом чрезмерного окрашивания, пожалуйста, очистите предметное стекло и окрасьте еще раз.

8. В Реагенте № 3 присутствуют неприятные запахи, поэтому необходимо соблюдать защитную изоляцию от него во время работы. При попадании на кожу или в глаза, пожалуйста, промойте большим количеством воды или немедленно обратитесь за медицинской помощью.

9. Все образцы спермы рассматриваются как потенциальные источники инфекции, все образцы и реагенты после тестирования следует утилизировать как клинические отходы, чтобы не загрязнять окружающую среду.

10. Набор для определения уровня ДФС – это диагностические реагенты *in vitro*, по результатам которых лечащие врачи могут получить информацию не для немедленного назначения лечения, а исключительно для выбора дальнейшей диагностической и лечебной тактики, основываясь на клинических проявлениях, других лабораторных обследованиях, истории болезни и т.д.

Методические рекомендации руководства ВОЗ (2021) и концепция разработанных операционных процедур первого российского технологического решения «ГалоСперм» совпадают по всем основным этапам Гало-теста, описание которого представлено доктором Fernandez JL вместе с соавторами [39] и включено в Главу «Расширенные исследования» [1] (табл. 4).

Таблица 4 / Table 4

Сравнение операционных процедур «ГалоСперм» и Гало-тест ВОЗ (2021)

Operational Process. HaloSperm vs SCD WHO (2021)

Операционные процедуры/ Operational Process	Время, мин/ Time, min	1	2
		SCD- тест ВОЗ (2021)/ SDC-test WHO (2021)	«ГалоСперм»/ HaloSperm
Подготовка предметных стекол с микрогелем/ Preparation of slides	90	да	нет
Подготовка образца эякулята (разведение образца эякулята до концентрации 5 – 10 млн/мл)/ Preparation of specimen (dilute the semen sample to a concentration of 5~10×10 ⁶ /ml)	5	да	да
Подготовка микрогеля (1)/Preparation of microgel (1)	20	да	нет
Подготовка микрогеля (2)/Preparation of microgel (2)	10	нет	да
Подготовка слайд-препаратов (1)/Preparation of slide-smears (1)	15	да	нет
Подготовка слайд-препаратов (2)/Preparation of slide-smears (2)	6	нет	да
Денатурация (1)/Denaturation (1)	15	да	нет
Денатурация (2)/Denaturation (2)	7	нет	да
Лизис (1)/Lysis (1)	30	да	нет
Лизис (2)/Lysis (2)	25	нет	да
Промывка (1)/Washing (1)	15	да	нет
Промывка (2)/Washing (2)	2	нет	да
Дегидратация/Denaturation	8	да	нет
Высушивание/Air-drying naturally	5	да	нет

Таблица 4. Продолжение / Table 4. Continuation

Операционные процедуры/ Operational Process	Время, мин/ Time, min	1	2
		SCD- тест ВОЗ (2021)/ SDC-test WHO (2021)	«ГалоСперм»/ HaloSperm
Окрашивание (1)/Staining (1)	15	да	нет
Окрашивание (2)/Staining (2)	8	нет	да
Промывка/Washing	2	да	да
Высушивание на воздухе/Air-drying naturally	10	да	да
Микроскопия, оценка результатов/ Microscopy, scoring	15	да	да
Этап/Stage		13 этапов	10 этапов
<i>TAT (1)</i>	245 мин = = 4 часа 5 мин		
<i>TAT (2)</i>	90 мин = 1,5 часа		

Необходимо отметить, что технология отечественного Набора менее трудоемкая, что проявляется сниженным ТАТ почти в 3 раза (табл. 4).

Как показали технологические испытания, сокращение количества операционных процедур не повлияло на качество полученных результатов. Так, по итогам теста «ГалоСперм» (рис. 2 – 5) микроскопическая картина, необходимая для правильной интерпретации наличия/отсутствия дисперсионного ореола (гало) полностью воспроизводит микроскопическую картину, полученную по итогам SCD, протокол которого представлен в руководстве ВОЗ (2021) [1] (см. рис. 1).

Заключение. Руководство ВОЗ (2021) предлагает линейку методов для измерения АФК и ДФС в сперме со своими преимуществами и ограничениями. На основе рекомендаций руководства [1] впервые в России были созданы Наборы для оценки репродуктивного здоровья мужчины: «ГалоСперм» – для оценки дисперсии ДНК-фрагментов сперматозоидов [41,61] и «ОксиСперм» (NBT-тест) для определения АФК в сперме взрослого мужчины (оценка ОС эякулята). Отечественные технологические решения полностью воспроизводят методы, описанные в руководстве ВОЗ (2021). К тому же простота в исполнении методик, доступный оценочный алгоритм результатов, а также возможность использования целевой аудитории специалистов в условиях КДЛ и РОСТ определяют преимущества созданных российских Наборов, что делает их применимыми в рутинной клинической и лабораторной практике. Для более глубоко-

го анализа доказательной базы, а также для разработки популяционных пороговых значений необходимы клинические испытания Наборов.

Список литературы

1. Who Laboratory Manual for the Examination and Processing of Human Semen. Sixth Edition. World Health Organization. 2021. Доступно по: <https://www.who.int/publications/i/item/9789240030787>. Ссылка активна на 23 августа 2023.
2. Jones R, Mann T, Sherins R. Peroxidative breakdown of phospholipids in human spermatozoa, spermicidal properties of fatty acid peroxides, and protective action of seminal plasma // Fertility and Sterility. 1979. Vol. 31, N5. P. 531–537.
3. Alvarez JG, Touchstone JC, Blasco L, Storey BT. Spontaneous lipid peroxidation and production of hydrogen peroxide and superoxide in human spermatozoa. Superoxide dismutase as major enzyme protectant against oxygen toxicity // Journal of andrology. 1987. Vol. 8, N5. P. 338–348.
4. Aitken RJ, Clarkson JS. Cellular basis of defective sperm function and its association with the genesis of reactive oxygen species by human spermatozoa // Journal of reproduction and fertility. 1987. Vol. 81, N2. P. 459–469.
5. Bisht S, Dada R. Oxidative stress: Major executioner in disease pathology, role in sperm DNA damage and preventive strategies // Frontiers in bioscience (Scholar edition) 2017. Vol. 9, N3. P. 420–447.
6. O’Flaherty C, Matsushita-Fournier D. Reactive oxygen species and protein modifications in spermatozoa // Biology of reproduction. 2017. Vol. 97, N4. P. 577–585.
7. Ko EY, Sabanegh ES Jr, Agarwal A. Male infertility testing: reactive oxygen species and antioxidant capacity // Fertility and sterility. 2014. Vol. 102, N6. P. 1518–1527.
8. Venkatesh S, Shamsi MB, Dudeja S, et al. Reactive oxygen species measurement in neat and washed semen: comparative analysis and its significance in male infertility assessment // Archives of gynecology and obstetrics. 2011. Vol. 283, N1. P. 121–126.

9. 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.
10. 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.
11. 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.
12. Сапожкова Ж.Ю., Милованова Г.А., Пацап О.И. Лабораторная диагностика мужского бесплодия. Маркеры. Часть I // *Лабораторная и клиническая медицина. Фармация*. 2021. Т. 1, №1. С. 57–68.
13. Aitken RJ. Impact of oxidative stress on male and female germ cells: implications for fertility // *Reproduction*. 2020. Vol. 159, N4. P. R189–R201.
14. Miller NJ, Rice-Evans C, Davies MJ. A new method for measuring antioxidant activity // *Biochemical Society transactions*. 1993. Vol. 21, N2. P. 95S.
15. Miller NJ, Rice-Evans CA. Factors influencing the antioxidant activity determined by the ABTS+ radical cation assay // *Free radical research* 1997. Vol. 26, N3. P. 195–199.
16. Chatterjee, et al. Role of Measurement of Reactive Oxygen Species in Semen Sample of Patients with Male Factor Infertility and Treatment with Antioxidants in Patients with High ROS Levels // *International Journal of Contemporary Medical Research*. 2019. Vol. 6, N2. P. 81–85.
17. Wymann MP, von Tscherner V, Deranleau DA, and Baggiolini M: The onset of the respiratory burst in human neutrophils. Real time studies of H₂O₂ formation reveal a rapid agonist-induced transduction process // *Journal of biological chemistry*. 1987. Vol. 262, N25. P. 12048–12053.
18. Muratori M, Marchiani S, Tamburrino L, Cambi M, Lotti F, Natali I et al. DNA fragmentation in brighter sperm predicts male fertility independently from age and semen parameters // *Fertility and sterility*. 2015. Vol. 104, N3. P. 582–90.e4.
19. Muratori M, Marchiani S, Tamburrino L, Baldi E. Sperm DNA Fragmentation: Mechanisms of Origin // *Advances in experimental medicine and biology*. 2019. Vol. 1166. P. 75–85.
20. Sakkas D, Alvarez JG. Sperm DNA fragmentation: mechanisms of origin, impact on reproductive outcome, and analysis // *Fertility and sterility*. 2010. Vol. 93, N4. P. 1027–1036.
21. Robinson L, Gallos ID, Conner SJ, Rajkhowa M, Miller D, Lewis S et al. The effect of sperm DNA fragmentation on miscarriage rates: a systematic review and meta-analysis // *Human Reproduction*. 2012. Vol. 27, N10. P. 2908–2917.
22. Cissen M, Wely MV, Scholten I, Mansell S, Bruin JP, Mol BW et al. Measuring Sperm DNA Fragmentation and Clinical Outcomes of Medically Assisted Reproduction: A Systematic Review and Meta-Analysis // *PLoS One*. 2016. Vol. 11, N11. P. e0165125.
23. Simon L, Zini A, Dyachenko A, Ciampi A, Carrell DT. A systematic review and meta-analysis to determine the effect of sperm DNA damage on in vitro fertilization and intracytoplasmic sperm injection outcome // *Asian Journal of Andrology*. 2017. Vol. 19, N1. P. 80–90.
24. Tan J, Taskin O, Albert A, Bedaiwy MA. Association between sperm DNA fragmentation and idiopathic recurrent pregnancy loss: a systematic review and meta-analysis // *Reproductive Biomedicine Online*. 2019. Vol. 38, N6. P. 951–960.
25. Evgeni E, Charalabopoulos K, Asimakopoulos B. Human sperm DNA fragmentation and its correlation with conventional semen parameters // *Journal of Reproduction and Infertility*. 2014. Vol. 15, N1. P. 2–14.
26. Klaude M, Eriksson S, Nygren J, Ahnstrom G. The comet assay: mechanisms and technical considerations // *Mutation Research*. 1996. Vol. 363, N2. P. 89–96.
27. McKelvey-Martin VJ, Melia N, Walsh IK, Johnston SR, Hughes CM, Lewis SE, et al. Two potential clinical applications of the alkaline single-cell gel electrophoresis assay: (1). Human bladder washings and transitional cell carcinoma of the bladder; and (2). Human sperm and male infertility // *Mutation Research*. 1997. Vol. 375, N2. P. 93–104.
28. Simon L, Carrell DT. Sperm DNA damage measured by comet assay // *Methods in Molecular Biology*. 2013. Vol. 927. P. 137–146.
29. Baumgartner A, Cemeli E, Anderson D. The comet assay in male reproductive toxicology // *Cell Biology and Toxicology* 2009. Vol. 25, N1. P. 81–98.
30. Konca K, Lankoff A, Banasik A, Lisowska H, Kuszewski T, Gozdz S, et al. A cross-platform public domain PC image-analysis program for the comet assay // *Mutation Research*. 2003. Vol. 534, N1–2. P. 15–20.
31. Gonzalez JE, Romero I, Barquinero JF, Garcia O. Automatic analysis of silver-stained comets by CellProfiler software // *Mutation Research*. 2012. Vol. 748, N1–2. P. 60–64.
32. Simon L, Castillo J, Oliva R, Lewis SE. Relationships between human sperm protamines, DNA damage and assisted reproduction outcomes // *Reproductive Biomedicine Online*. 2011. Vol. 23, N6. P. 724–734.
33. Ribas-Maynou J, Garcia-Peiro A, Fernandez-Encinas A, Abad C, Amengual MJ, Prada E., et al. Comprehensive analysis of sperm DNA fragmentation by five different assays: TUNEL assay, SCSA, SCD test and alkaline and neutral Comet assay // *Andrology*. 2013. Vol. 1, N5. P. 715–722.
34. Javed A, Talkad MS, Ramaiah MK. Evaluation of sperm DNA fragmentation using multiple methods: a comparison of their predictive power for male infertility // *Clinical and experimental reproductive medicine*. 2019. Vol. 46, N1. P. 14–21.
35. Evenson DP. Sperm chromatin structure assay (SCSA(R)) // *Methods in molecular biology* 2013. Vol. 927. P. 147–64.
36. Evenson DP, Jost LK, Marshall D, Zinaman MJ, Clegg E, Purvis K et al. Utility of the sperm chromatin structure assay as a diagnostic and prognostic tool in the human fertility clinic // *Human Reproduction*. 1999. Vol. 14, N4. P. 1039–1049.
37. Giwercman A, Lindstedt L, Larsson M, Bungum M, Spano M, Levine RJ et al. Sperm chromatin structure assay as an independent predictor of fertility in vivo: a case-control study // *International journal of andrology*. 2010. Vol. 33, N1. P. e221.
38. Martinez MG, Sanchez-Martin P, Dorado-Silva M, Fernandez JL, Girones E, Johnston SD et al. Magnetic-activated cell sorting is not completely effective at reducing sperm DNA fragmentation // *Journal of assisted reproduction and genetics*. 2018. Vol. 35, N12. P. 2215–2221.
39. Fernandez JL, Cajigal D, Lopez-Fernandez C, Gosalvez J. Assessing sperm DNA fragmentation with the sperm chromatin dispersion test // *Methods in molecular biology* 2011. Vol. 682. P. 291–301.
40. Fernandez JL, Muriel L, Goyanes V, Segrelles E, Gosalvez J, Enciso M, et al. Simple determination of human sperm DNA fragmentation with an improved sperm chromatin dispersion test. *Fertility and Sterility*. 2005. Vol. 84, N4. P. 833–842.
41. Сапожкова Ж.Ю., Еремич К.И., Пацап О.И. Оценка дисперсии ДНК-фрагментов сперматозоидов у мужчин с бесплодием: из клинических исследований первого

русского набора ГЕМСТАНДАРТ – ГалоСперм Л&К // Лабораторная и клиническая медицина. Фармация. 2022. Т. 2, №3. С. 37–56.

42. Gosalvez J, Rodriguez-Predreira M, Mosquera A, Lopez-Fernandez C, Esteves SC, Agarwal A, et al. Characterisation of a subpopulation of sperm with massive nuclear damage, as recognised with the sperm chromatin dispersion test // *Andrologia*. 2014. Vol. 46, N6. P. 602–609.

43. Gallegos G, Ramos B, Santiso R, et al. Sperm DNA fragmentation in infertile men with genitourinary infection by *Chlamydia trachomatis* and *Mycoplasma* // *Fertility and Sterility*. 2008. Vol. 90, N2. P. 328–334.

44. Enciso M, Muriel L, Fernández JL, et al. Infertile men with varicocele show a high relative proportion of sperm cells with intense nuclear damage level, evidenced by the sperm chromatin dispersion test // *Journal of Andrology*. 2006. Vol. 27, N1. P. 106–111.

45. Chohan KR, Griffin JT, Lafromboise M, De Jonge CJ, Carrell DT. Comparison of chromatin assays for DNA fragmentation evaluation in human sperm // *Journal of Andrology*. 2006. Vol. 27, N1. P. 53–59.

46. Bungum M, Humaidan P, Axmon A, Spano M, Bungum L, Erenpreiss J. and Giwercman A. Sperm DNA integrity assessment in prediction of assisted reproduction technology outcome // *Human Reproduction*. 2007. Vol. 22, N1. P. 174–179.

47. Payne JF, Raburn DJ, Couchman GM, Price®, Jamison MG, Walmer DK. Redefining the relationship between sperm deoxyribonucleic acid fragmentation as measured by the sperm chromatin structure assay and outcomes of assisted reproductive techniques // *Fertility and Sterility*. 2005. Vol. 84, N2. P. 356–364.

48. Evenson DP, Jost LK, Marshall D, et al. Utility of the sperm chromatin structure assay as a diagnostic and prognostic tool in the human fertility clinic // *Human Reproduction*. 1999. Vol. 14, N4. P. 1039–1049.

49. Spano M, Bonde JP, Hjollund HI, Kolstad HA, Cordelli E, Leter G. Sperm chromatin damage impairs human fertility. The Danish First Pregnancy Planner Study Team // *Fertility and Sterility*. 2000. Vol. 73, N1. P. 43–50.

50. Larson KL, DeJonge CJ, Barnes AM, Jost LK, Evenson DP. Sperm chromatin structure assay For professional use only BRED-0026/8 parameters as predictors of failed pregnancy following assisted reproductive techniques // *Human Reproduction*. 2000. Vol. 15, N8. P. 1717–1722.

51. Larson-Cook KL, Brannian JD, Hansen KA, Kasperon KM, Aamold ET, Evenson DP. Relationship between the outcomes of assisted reproductive techniques and sperm DNA fragmentation as measured by the sperm chromatin structure assay // *Fertility and Sterility*. 2003. Vol. 80, P. 895–902.

52. Saleh RA, Agarwal A, Nada EA, et al. Negative effects of increased sperm DNA damage in relation to seminal oxidative stress in men with idiopathic and male factor infertility // *Fertility and Sterility*. 2003. Vol. 79, Suppl 3. P. 1597–1605.

53. Boe-Hansen GB, Fedder J, Ersboll AK, Christensen P. The sperm chromatin structure assay as a diagnostic tool in the human fertility clinic // *Human Reproduction*. 2006. Vol. 21, N6. P. 1576–1582.

54. Gandini L, Lombardo F, Paoli D, et al. Full-term pregnancies achieved with ICSI despite high levels of sperm chromatin damage // *Human Reproduction*. 2004. Vol. 19, N6. P. 1409–1417.

55. Zini A, Meriano J, Kader K, Jarvi K, Laskin CA, Cadesky K. Potential adverse effect of sperm DNA damage on embryo quality after ICSI // *Human Reproduction*. 2005. Vol. 20, N12. P. 3476–3480.

56. Greco E, Romano S, Iacobelli M, et al. ICSI in cases of sperm DNA damage: beneficial effect of oral antioxidant treatment // *Human Reproduction*. 2005. Vol. 20, N9. P. 2590–2594.

57. Alvarez C, Castilla JA, Martinez L, Ramirez JP, Vergara F, Gaforio JJ. Biological variation of seminal parameters in healthy subjects // *Human Reproduction*. 2003. Vol. 18. P. 2082–2088.

58. Keel BA. Within- and between-subject variation in semen parameters in infertile men and normal semen donors // *Fertility and Sterility*. 2006. Vol. 85, N1. P. 128–134.

59. Smit M, Dohle GR, Weber RFA, Romijn H. Sperm DNA damage is associated with impaired spermatogenesis, rather than with post testicular etiologies // *Journal of Andrology*. 2006. P. 71.

60. Erenpreiss J, Bungum M, Spano M, Elzanaty S, Orbicans J, Giwercman A. Intraindividual variation in sperm chromatin structure assay parameters in men from infertile couples: clinical implications // *Human Reproduction*. 2006. Vol. 21, N8. P. 2061–2064.

61. Сапожкова Ж.Ю. Способ лабораторной диагностики мужской репродуктивной функции на базе оценки дисперсии ДНК-фрагментов сперматозоидов. Патент РФ №2795567. Заявл. 2022131789, 06.12.2022. Опубл. 05.05.2023. Бюл. № 13

References

1. WHO laboratory manual for the examination and processing of human semen. Sixth Edition. World Health Organization. 2021 Available at: <https://www.who.int/publications/item/9789240030787>. Accessed: 23 Aug 2023.

2. Jones R, Mann T, Sherins R. Peroxidative breakdown of phospholipids in human spermatozoa, spermicidal properties of fatty acid peroxides, and protective action of seminal plasma. *Fertil Steril*. 1979;31(5):531–7. DOI: 10.1016/s0015-0282(16)43999-3

3. Alvarez JG, Touchstone JC, Blasco L, Storey BT. Spontaneous lipid peroxidation and production of hydrogen peroxide and superoxide in human spermatozoa. Superoxide dismutase as major enzyme protectant against oxygen toxicity. *J Androl*. 1987;8(5):338–48. DOI: 10.1002/j.1939-4640.1987.tb00973.x

4. Aitken RJ, Clarkson JS. Cellular basis of defective sperm function and its association with the genesis of reactive oxygen species by human spermatozoa. *J Reprod Fertil*. 1987;81(2):459–69. DOI: 10.1530/jrf.0.0810459

5. Bisht S, Dada R. Oxidative stress: Major executioner in disease pathology, role in sperm DNA damage and preventive strategies. *Front Biosci (Schol Ed)*. 2017;9(3):420–47. DOI: 10.2741/s495

6. O'Flaherty C, Matsushita-Fournier D. Reactive oxygen species and protein modifications in spermatozoa. *Biol Reprod*. 2017;97(4):577–85. DOI: 10.1093/biolre/iox104

7. Ko EY, Sabanegh ES Jr, Agarwal A. Male infertility testing: reactive oxygen species and antioxidant capacity. *Fertil Steril*. 2014;102(6):1518–27. DOI: 10.1016/j.fertnstert.2014.10.020

8. Venkatesh S, Shamsi MB, Dudeja S, Kumar R, Dada R. Reactive oxygen species measurement in neat and washed semen: comparative analysis and its significance in male infertility assessment. *Arch Gynecol Obstet*. 2011;283(1):121–6. DOI: 10.1007/s00404-010-1645-4

9. 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):635–42. DOI: 10.1016/j.fertnstert.2004.11.022

10. 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):717–23.

11. Sapozhkova ZhYu, Eremin KI, Patsap OI. Sperm Chromatin Dispersion Test for Examination of Infertile Male: From Clinical Trials of First Russian Kit GEMSTANDART-HaloSperm L&Q. *Laboratory and Clinical Medicine. Pharmacy.* 2022;2(3):37–56. (In Russ). DOI: 10.14489/lcmp.2022.03.pp.037–056
12. 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
13. Aitken RJ. Impact of oxidative stress on male and female germ cells: implications for fertility. *Reproduction.* 2020;159(4):R189–R201. DOI: 10.1530/REP-19-0452
14. Miller NJ, Rice-Evans C, Davies MJ. A new method for measuring antioxidant activity. *Biochem Soc Trans.* 1993;21(2):95S. DOI: 10.1042/bst021095s
15. Miller NJ, Rice-Evans CA. Factors influencing the antioxidant activity determined by the ABTS+ radical cation assay. *Free Radic Res.* 1997;26(3):195–9. DOI: 10.3109/10715769709097799
16. Chatterjee, et al. Role of Measurement of Reactive Oxygen Species in Semen Sample of Patients with Male Factor Infertility and Treatment with Antioxidants in Patients with High ROS Levels. *International Journal of Contemporary Medical Research.* 2019;6(2):81–5. DOI: 10.21276/ijcmr.2019.6.2.30
17. Wymann MP, von Tscherner V, Deranleau DA, Baggiolini M. The onset of the respiratory burst in human neutrophils. Real-time studies of H₂O₂ formation reveal a rapid agonist-induced transduction process. *J Biol Chem.* 1987;262(25):12048–53.
18. Muratori M, Marchiani S, Tamburrino L, et al. DNA fragmentation in brighter sperm predicts male fertility independently from age and semen parameters. *Fertil Steril.* 2015;104(3):582–90.e4. DOI: 10.1016/j.fertnstert.2015.06.005
19. Muratori M, Marchiani S, Tamburrino L, Baldi E. Sperm DNA Fragmentation: Mechanisms of Origin. *Adv Exp Med Biol.* 2019;1166:75–85. DOI: 10.1007/978-3-030-21664-15
20. Sakkas D, Alvarez JG. Sperm DNA fragmentation: mechanisms of origin, impact on reproductive outcome, and analysis. *Fertil Steril.* 2010;93(4):1027–36. DOI: 10.1016/j.fertnstert.2009.10.046
21. Robinson L, Gallos ID, Conner SJ, et al. The effect of sperm DNA fragmentation on miscarriage rates: a systematic review and meta-analysis. *Hum Reprod.* 2012;27(10):2908–17. DOI: 10.1093/humrep/des261
22. Cissen M, Wely MV, Scholten I, et al. Measuring Sperm DNA Fragmentation and Clinical Outcomes of Medically Assisted Reproduction: A Systematic Review and Meta-Analysis. *PLoS One.* 2016;11(11):e0165125. DOI: 10.1371/journal.pone.0165125
23. Simon L, Zini A, Dyachenko A, Ciampi A, Carrell DT. A systematic review and meta-analysis to determine the effect of sperm DNA damage on in vitro fertilization and intracytoplasmic sperm injection outcome. *Asian J Androl.* 2017;19(1):80–90. DOI: 10.4103/1008-682X.182822
24. Tan J, Taskin O, Albert A, Bedaiwy MA. Association between sperm DNA fragmentation and idiopathic recurrent pregnancy loss: a systematic review and meta-analysis. *Reprod Biomed Online.* 2019;38(6):951–60. DOI: 10.1016/j.rbmo.2018.12.029
25. Evgeni E, Charalabopoulos K, Asimakopoulos B. Human sperm DNA fragmentation and its correlation with conventional semen parameters. *J Reprod Infertil.* 2014;15(1):2–14.
26. Klaude M, Eriksson S, Nygren J, Ahnström G. The comet assay: mechanisms and technical considerations. *Mutat Res.* 1996;363(2):89–96. DOI: 10.1016/0921-8777(95)00063-1
27. McKelvey-Martin VJ, Melia N, Walsh IK, et al. Two potential clinical applications of the alkaline single-cell gel electrophoresis assay: (1). Human bladder washings and transitional cell carcinoma of the bladder; and (2). Human sperm and male infertility. *Mutat Res.* 1997;375(2):93–104. DOI: 10.1016/s0027-5107(97)00005-5
28. Simon L, Carrell DT. Sperm DNA damage measured by comet assay. *Methods Mol Biol.* 2013;927:137–46. DOI: 10.1007/978-1-62703-038-013
29. Baumgartner A, Cemeli E, Anderson D. The comet assay in male reproductive toxicology. *Cell Biol Toxicol.* 2009;25(1):81–98. DOI: 10.1007/s10565-007-9041-y
30. Końca K, Lankoff A, Banasik A, et al. A cross-platform public domain PC image-analysis program for the comet assay. *Mutat Res.* 2003;534(1–2):15–20. DOI:10.1016/s1383-5718(02)00251-6
31. González JE, Romero I, Barquinero JF, García O. Automatic analysis of silver-stained comets by CellProfiler software. *Mutat Res.* 2012;748(1–2):60–64. DOI: 10.1016/j.mrgentox.2012.06.007
32. Simon L, Castillo J, Oliva R, Lewis SE. Relationships between human sperm protamines, DNA damage and assisted reproduction outcomes. *Reprod Biomed Online.* 2011;23(6):724–734. DOI: 10.1016/j.rbmo.2011.08.010
33. Ribas-Maynou J, García-Peiró A, Fernández-Encinas A, et al. Comprehensive analysis of sperm DNA fragmentation by five different assays: TUNEL assay, SCSA, SCD test and alkaline and neutral Comet assay. *Andrology.* 2013;1(5):715–22. DOI: 10.1111/j.2047-2927.2013.00111.x
34. Javed A, Talkad MS, Ramaiah MK. Evaluation of sperm DNA fragmentation using multiple methods: a comparison of their predictive power for male infertility. *Clin Exp Reprod Med.* 2019;46(1):14–21.
35. Evenson DP. Sperm chromatin structure assay (SCSA®). *Methods Mol Biol.* 2013;927:147–64. DOI:10.1007/978-1-62703-038-014
36. Evenson DP, Jost LK, Marshall D, et al. Utility of the sperm chromatin structure assay as a diagnostic and prognostic tool in the human fertility clinic. *Hum Reprod.* 1999;14(4):1039–49. DOI: 10.1093/humrep/14.4.1039
37. Giwercman A, Lindstedt L, Larsson M, et al. Sperm chromatin structure assay as an independent predictor of fertility in vivo: a case-control study. *Int J Androl.* 2010;33(1):e221–e227. DOI: 10.1111/j.1365-2605.2009.00995.x
38. Martínez MG, Sánchez-Martín P, Dorado-Silva M, et al. Magnetic-activated cell sorting is not completely effective at reducing sperm DNA fragmentation. *J Assist Reprod Genet.* 2018;35(12):2215–21. DOI: 10.1007/s10815-018-1319-x
39. Fernández JL, Cajigal D, López-Fernández C, Gosálvez J. Assessing sperm DNA fragmentation with the sperm chromatin dispersion test. *Methods Mol Biol.* 2011;682:291–301. DOI: 10.1007/978-1-60327-409-821
40. Fernández JL, Muriel L, Goyanes V, et al. Simple determination of human sperm DNA fragmentation with an improved sperm chromatin dispersion test. *Fertil Steril.* 2005;84(4):833–42. DOI: 10.1016/j.fertnstert.2004.11.089
41. Sapozhkova ZhYu, Eremin KI, Patsap OI. Sperm Chromatin Dispersion Test for Examination of Infertile Male: From Clinical Trials of First Russian Kit GEMSTANDART-HaloSperm L&Q. *Laboratory and Clinical Medicine. Pharmacy.* 2022;2(3):37–56. (In Russ). DOI: 10.14489/lcmp.2022.03.pp.037–056
42. Gosálvez J, Rodríguez-Predreira M, Mosquera A, et al. Characterisation of a subpopulation of sperm with massive nuclear damage, as recognised with the sperm chromatin dispersion test. *Andrologia.* 2014;46(6):602–9. DOI: 10.1111/and.12118
43. Gallegos G, Ramos B, Santiso R, Goyanes V, Gosálvez J, Fernández JL. Sperm DNA fragmentation in infertile men with genitourinary infection by Chlamydia trachomatis and Mycoplasma. *Fertil Steril.* 2008;90(2):328–34. DOI: 10.1016/j.fertnstert.2007.06.035

44. Enciso M, Muriel L, Fernández JL, et al. Infertile men with varicocele show a high relative proportion of sperm cells with intense nuclear damage level, evidenced by the sperm chromatin dispersion test. *J Androl.* 2006;27(1):106–11. DOI: 10.2164/jandrol.05115
45. Chohan KR, Griffin JT, Lafromboise M, De Jonge CJ, Carrell DT. Comparison of chromatin assays for DNA fragmentation evaluation in human sperm. *J Androl.* 2006;27(1):53–9. DOI: 10.2164/jandrol.05068
46. Bungum M, Humaidan P, Axmon A, et al. Sperm DNA integrity assessment in prediction of assisted reproduction technology outcome. *Hum Reprod.* 2007;22(1):174–9. DOI: 10.1093/humrep/del326
47. Payne JF, Raburn DJ, Couchman GM, Price TM, Jamison MG, Walmer DK. Redefining the relationship between sperm deoxyribonucleic acid fragmentation as measured by the sperm chromatin structure assay and outcomes of assisted reproductive techniques. *Fertil Steril.* 2005;84(2):356–64. DOI: 10.1016/j.fertnstert.2005.02.032
48. Evenson DP, Jost LK, Marshall D, et al. Utility of the sperm chromatin structure assay as a diagnostic and prognostic tool in the human fertility clinic. *Hum Reprod.* 1999;14(4):1039–49. DOI: 10.1093/humrep/14.4.1039
49. Spanò M, Bonde JP, Hjøllund HI, Kolstad HA, Cordelli E, Leter G. Sperm chromatin damage impairs human fertility. The Danish First Pregnancy Planner Study Team. *Fertil Steril.* 2000;73(1):43–50. DOI:10.1016/S0015-0282(99)00462-8
50. Larson KL, DeJonge CJ, Barnes AM, Jost LK, Evenson DP. Sperm chromatin structure assay parameters as predictors of failed pregnancy following assisted reproductive techniques. *Hum Reprod.* 2000;15(8):1717–22. DOI: 10.1093/humrep/15.8.1717
51. Larson-Cook KL, Brannian JD, Hansen KA, Kasperson KM, Aamold ET, Evenson DP. Relationship between the outcomes of assisted reproductive techniques and sperm DNA fragmentation as measured by the sperm chromatin structure assay. *Fertil Steril.* 2003;80(4):895–902. DOI: 10.1016/S0015-0282(03)01116-6
52. Saleh RA, Agarwal A, Nada EA, et al. Negative effects of increased sperm DNA damage in relation to seminal oxidative stress in men with idiopathic and male factor infertility. *Fertil Steril.* 2003;79(Suppl 3):1597–1605. DOI:10.1016/S0015-0282(03)00337-6
53. Boe-Hansen GB, Fedder J, Ersbøll AK, Christensen P. The sperm chromatin structure assay as a diagnostic tool in the human fertility clinic. *Hum Reprod.* 2006;21(6):1576–82. DOI: 10.1093/humrep/del019
54. Gandini L, Lombardo F, Paoli D, et al. Full-term pregnancies achieved with ICSI despite high levels of sperm chromatin damage. *Hum Reprod.* 2004;19(6):1409–17. DOI: 10.1093/humrep/deh233
55. Zini A, Meriano J, Kader K, Jarvi K, Laskin CA, Cadesky K. Potential adverse effect of sperm DNA damage on embryo quality after ICSI. *Hum Reprod.* 2005;20(12):3476–80. DOI: 10.1093/humrep/dei266
56. Greco E, Romano S, Iacobelli M, et al. ICSI in cases of sperm DNA damage: beneficial effect of oral antioxidant treatment. *Hum Reprod.* 2005;20(9):2590–4. DOI: 10.1093/humrep/dei091
57. Alvarez C, Castilla JA, Martínez L, Ramírez JP, Vergara F, Gaforio JJ. Biological variation of seminal parameters in healthy subjects. *Hum Reprod.* 2003;18(10):2082–8. DOI: 10.1093/humrep/deg430
58. Keel BA. Within- and between-subject variation in semen parameters in infertile men and normal semen donors. *Fertil Steril.* 2006;85(1):128–34. DOI: 10.1016/j.fertnstert.2005.06.048
59. Smit M, Dohle GR, Weber RFA, Romijn H. Sperm DNA damage is associated with impaired spermatogenesis, rather than with post testicular etiologies. *Journal of Andrology.* 2006;71.
60. Erenpreiss J, Bungum M, Spano M, Elzanaty S, Orbidans J, Giwerzman A. Intra-individual variation in sperm chromatin structure assay parameters in men from infertile couples: clinical implications. *Hum Reprod.* 2006;21(8):2061–4. DOI: 10.1093/humrep/del134
61. Sapozhkova ZhY. *Sposob laboratory diagnostici muzhskoy reproduktivnoy funktsii na base otcenki dispersii DNK fragmentov spermatozoidov.* Patent RUS №2795567. Declared 2022131789, 06.12.2022. Published 05.05.2023. Byul. №13. (In Russ).

Поступила в редакцию / Received 27.08.2023

Принята к публикации / Accepted 31.08.2023

Конфликт интересов. Автор заявляет об отсутствии конфликта интересов.

Conflict of interest. The author declares no conflict of interest.

Финансирование. Исследование проведено без спонсорской поддержки.

Financing. The study was conducted without sponsorship.

Сведения об авторах / Information about authors



Жанна Юрьевна Давидова – к.м.н., руководитель Международной Школы Цитологии и Медицинской Школы Инноваций, Москва, Россия; руководитель клинико-диагностической лаборатории, Подольский диагностический центр, Подольск, Россия.

Zhanna Yu. Davidova – MD, PhD, The International Cytology School & Innovative Medical School, Head, Moscow, Russia; Medical Laboratory, Podolsk Diagnostic Center, Head, Podolsk, Russia.

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

ORCID: 0000-0003-3068-2260