

МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РЕСПУБЛИКИ БЕЛАРУСЬ

УТВЕРЖДАЮ
Первый заместитель Министра
_____ Д.Л. Пиневиц
_____ 2016 г.
Регистрационный № 196-1115



МЕТОД ДИАГНОСТИКИ ГЕНЕТИЧЕСКИ ОБУСЛОВЛЕННЫХ
ФОРМ МУЖСКОГО БЕСПЛОДИЯ
инструкция по применению

УЧРЕЖДЕНИЯ-РАЗРАБОТЧИКИ:

ГУ «Республиканский научно-практический центр «Мать и дитя»

ГНУ «Институт генетики и цитологии НАН Беларуси»

АВТОРЫ: к.м.н. Прибушеня О.В., к.б.н. Головатая Е.И., Маркевич А.Л.,
Требка Е.А., к.м.н. Наумчик И.В., к.б.н. Рябоконт Н.И., Никитченко Н.В.

Минск, 2015

**МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ
РЕСПУБЛИКИ БЕЛАРУСЬ**

УТВЕРЖДАЮ
Первый заместитель министра

_____ Д.Л. Пиневиц
18.03.2016
Регистрационный № 196-1115

**МЕТОД ДИАГНОСТИКИ ГЕНЕТИЧЕСКИ ОБУСЛОВЛЕННЫХ ФОРМ
МУЖСКОГО БЕСПЛОДИЯ**

инструкция по применению

УЧРЕЖДЕНИЯ-РАЗРАБОТЧИКИ: ГУ «Республиканский научно-практический
центр “Мать и дитя”», ГНУ «Институт генетики и цитологии НАН Беларуси»

АВТОРЫ: канд. мед. наук О.В. Прибушеня, канд. биол. наук Е.И. Головатая,
А.Л. Макаревич, Е.А. Требка, канд. мед. наук И.В. Наумчик, канд. биол. наук
Н.И. Рябоконе, Н.В. Никитченко

Минск 2015

В настоящей инструкции по применению (далее — инструкция) изложен метод диагностики генетически обусловленных форм мужского бесплодия, использование которого позволит повысить эффективность диагностики генетически обусловленных заболеваний, приводящих к нарушению фертильности у мужчин.

Инструкция предназначена для врачей-урологов, врачей-андрологов, врачей-генетиков, а также врачей-специалистов центров вспомогательных репродуктивных технологий, врачей-акушеров-гинекологов.

ПОКАЗАНИЯ К ПРИМЕНЕНИЮ

Тяжелое нарушение сперматогенеза (нарушение количества, подвижности, морфологии сперматозоидов).

Гипогонадизм.

Пороки развития половых органов.

Крипторхизм.

Гипоплазия яичек (объем менее 15 см³).

ПРОТИВОПОКАЗАНИЯ ДЛЯ ПРИМЕНЕНИЯ

Отсутствуют.

ОПИСАНИЕ ТЕХНОЛОГИИ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ МЕТОДА

Этапы диагностики

Клинический осмотр.

Клинико-лабораторные исследования (приложение 1).

Инструментальные исследования (согласно приложение 1).

Выделение групп пациентов, нуждающихся в кариотипировании и проведении ДНК-исследований (рисунок).

Генетические тесты

Кариотипирование лимфоцитов периферической крови

Показания:

- выраженная олигоспермия (менее 5 млн сперматозоидов в 1 мл);
- азооспермия;
- гипогонадизм;
- пороки развития половых органов;
- крипторхизм;
- задержка физического развития.

Исследования на микроделеции Y хромосомы

Исследование фактора азооспермии — AZF-локусов — проводится пациентам с азооспермией или тяжелой олигоспермией при нормальном кариотипе, выполненном в культуре лимфоцитов периферической крови. Пациентам с хромосомными аномалиями, обструктивной азооспермией или гипогонадотропным гипогонадизмом молекулярная диагностика микроделций не показана (приложение 1).

Исследование на носительство мутаций в гене трансмембранного регуляторного белка муковисцидоза (ТРБМ)

Показания:

- азооспермия неуточненного генеза (отбор пациентов проводится с учетом диагноза, поставленного на основании общего и специального андрологического исследования, двукратного стандартного исследования спермы (менее 1 млн сперматозоидов в 1 мл) и определения уровня половых гормонов в сыворотке крови);

- врожденное двустороннее отсутствие семявыносящих протоков (клинический диагноз должен быть подтвержден результатами трансректальной ультрасонографии);

- наличие мутации у близких родственников и в первую очередь родных сибсов (при выявлении носительства мутации у пациента).

Исследование ДНК-комет в спермиях (приложение 2).

Показания:

- бесплодие (неустановленная причина);

- привычное невынашивание (неустановленная причина);

- повторные неуспешные ЭКО (неустановленная причина);

- подготовка к ВРТ (по желанию семьи);

- заморозка спермы для длительного хранения и донорство спермы;

- возраст мужчины более 45 лет;

- острые и хронические воспалительные заболевания органов мужской мочеполовой системы;

- острые и хронические экстрагенитальные заболевания;

- курение, прием алкоголя, прием лекарственных средств и наркотиков, химио- и радиотерапия, воздействие вредных химических веществ.

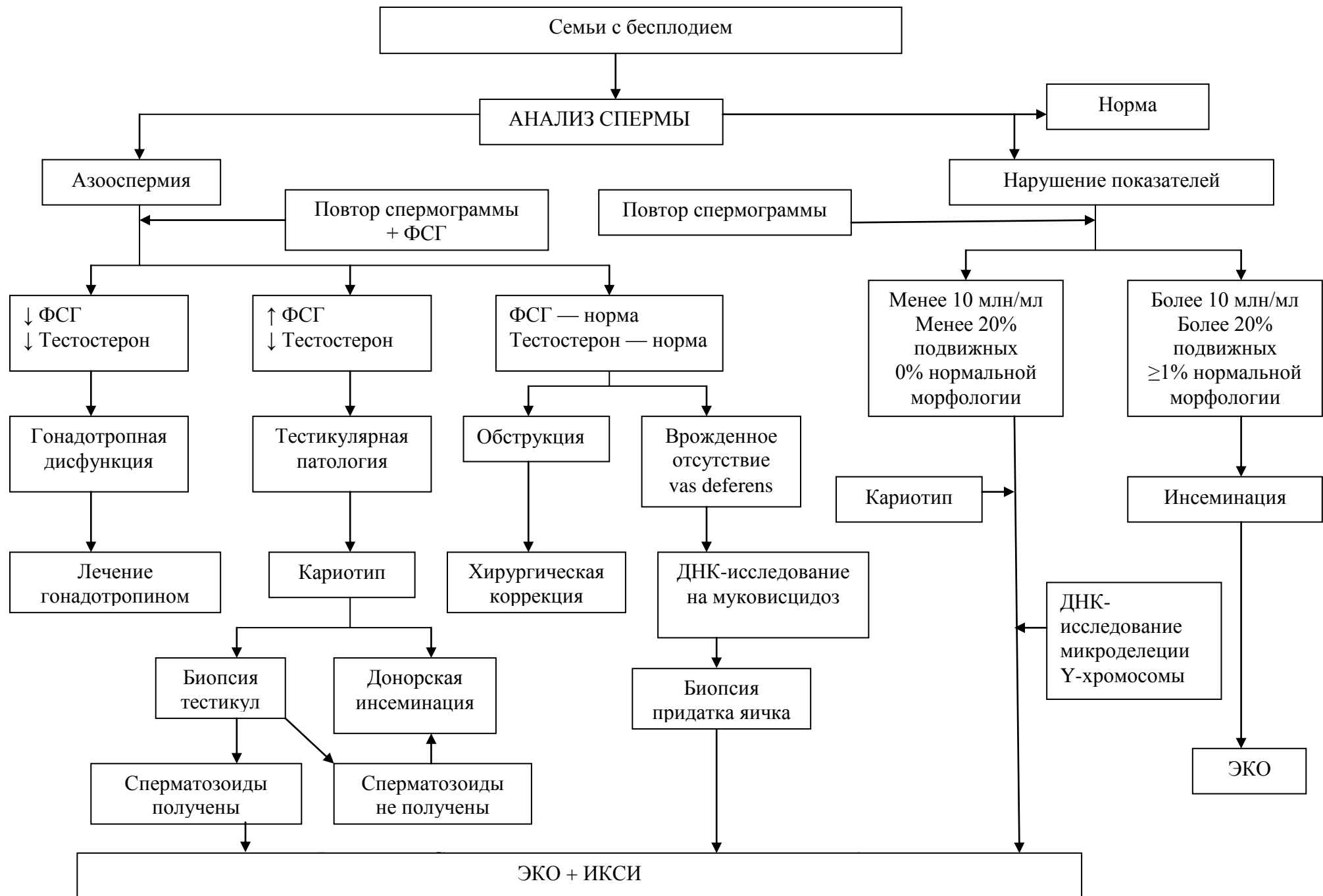
Диагностика

Постановка диагноза и методы коррекции и медицинской профилактики представлены на рисунке. Примеры расчета среднего количества повреждений ДНК в сперматозоидах представлены в приложении 2.

ПЕРЕЧЕНЬ ВОЗМОЖНЫХ ОСЛОЖНЕНИЙ ИЛИ ОШИБОК ПРИ ВЫПОЛНЕНИИ И ПУТИ ИХ УСТРАНЕНИЯ

Ошибки, связанные с нарушением правил забора, транспортировки, хранения биологического материала и выполнения лабораторных исследований.

Для предупреждения возникновения ошибок этой группы следует строго соблюдать правила работы с биологическим материалом и проведения лабораторных исследований. Учитывая высокую чувствительность метода ПЦР, необходимо избегать загрязнения исследуемых образцов инородным биологическим материалом.



Алгоритм обследования пациентов мужского пола с нарушениями фертильности

Первичное обследование

Жалобы: отсутствие беременностей (бесплодие) у супружеской пары, ухудшение общего самочувствия (слабость, раздражительность, утомляемость, уменьшение работоспособности, нарушение сна), снижение общего тонуса, изменение типа и интенсивности оволосения, недостаточность эрективной функции, ослабление полового влечения и сексуальных фантазий.

Анамнез:

1. Сбор семейного анамнеза, наследственные и врожденные заболевания, бесплодие и привычное невынашивание беременности у родственников.

2. Перенесенные экстрагенитальные заболевания (бронхиты, синуситы и др.), хронические наиболее распространенные мультифакторные заболевания (сахарный диабет, бронхиальная астма, системные заболевания соединительной ткани, заболевания печени и почек, инфекционные заболевания).

3. Перенесенные заболевания половых органов (орхит, крипторхизм, варикоцеле, грыжи, гипоспадия) и методы их лечения.

4. Сбор анамнеза, характеризующего «семейный» статус (возраст начала половой жизни, количество браков, методы контрацепции, кратность коитусов и др.).

5. Анамнез заболевания: когда пациент впервые обратился к урологу (андрологу) по поводу бесплодия, все методы диагностики и лечения по поводу бесплодия в динамике.

6. Сбор данных о терато- и мутагенном воздействии. Особое внимание следует обратить на факторы, которые приводят к нарушению сперматогенеза:

- лекарственные средства (антидепрессанты, гипотензивные препараты, антибиотики, цитостатики, анаболические гормоны и др.);

- воздействие высокой температуры, экзогенных токсинов;

- интенсивность физических нагрузок;

- вредные привычки (алкоголь, курение, наркотики).

Клинико-лабораторное исследование

Физикальное исследование

1. Осмотр проводится при вертикальном положении пациента, комфортной температуре в помещении и теплых руках врача. При общем физическом исследовании оценивается рост, масса тела, артериальное давление, особенности телосложения, тип распределения волосяного покрова, толщина подкожно-жировой клетчатки. Форма и степень развития молочных и половых желез оценивается по шкале Tanner. Проводится осмотр и пальпация молочных желез для выявления ложной и истинной гинекомастии.

2. Оценка уrogenитального статуса: осмотр и пальпаторное исследование полового члена и органов мошонки с указанием положения, консистенции

и размеров яичек, придатков и семявыносящих протоков, при этом нормальные размеры яичка соответствуют 15 мл и больше и определяются с помощью орхидометра Прадера. Для выявления состояния придаточных половых желез выполняется ректальное пальцевое исследование предстательной железы и семенных пузырьков, которые в норме не пальпируются.

Исследование спермы

1. Сбор и транспортировка спермы. Сперма получается путем мастурбации и собирается в чистую сухую стеклянную (пластиковую) емкость с широким горлом. Образец должен быть доставлен в лабораторию не позднее чем через 1–2 ч от момента сбора образца. Все манипуляции с хранением и транспортировкой спермы осуществляются при температуре не ниже 20°C и не выше 36°C. Проба, собранная не полностью, не анализируется. Перед сбором образца спермы необходимо соблюдать половой покой 3–5 дней, отказ от алкоголя, бань, саун, горячих ванн, приема антибиотиков не менее 7 дней до сдачи анализа. Температура тела не должна превышать 37,5°C.

2. Нормы спермограммы представлены в таблице 1.

Таблица 1. — Нормы спермограммы (ВОЗ, 2010)

Показатели спермограммы	Нормальные референтные значения (нижнее значение)
Объем	2 мл и более (1,5 мл)
pH	7,2–7,8
Вязкость	3 (0–4)
Концентрация	20 млн/мл (15 млн/мл)
Общее количество сперматозоидов	>40 млн (39 млн в эякуляте)
Подвижность	>50% с прогрессивно-поступательным движением (прогрессивное движение = 32%)
Морфология	>14% нормальных форм (4%)
Жизнеспособность	75% и более живых (58%)
Лейкоциты	1 млн/мл
Эритроциты	5 млн/мл
Агглютинация	10% сперматозоидов, склеенных между собой

3. Оценка спермограммы (таблица 2). При концентрации сперматозоидов 15 млн/мл и более и прогрессивно подвижных 32% и более спермограмма считается нормальной, и достаточно ограничиться одним анализом спермы. При патологии анализ спермы выполняется дважды с интервалом в 14–15 дней с половым воздержанием не менее 3-х и не более 5 дней. Если результаты двух исследований резко отличаются друг от друга, выполняется третий анализ. Из двух спермограмм оценивается лучший результат. При отсутствии спермы и наличии оргазма исследуются осадок посторгазменной мочи после центрифугирования для выявления в ней сперматозоидов. Наличие их свидетельствует о ретроградной эякуляции.

Таблица 2. — Номенклатура патологии спермы (Lipsyultz, 2009)

Аспермия	Отсутствие эякулята
Олигоспермия/олигозооспермия	Концентрация сперматозоидов менее 15 млн/мл
Полизооспермия	Концентрация сперматозоидов более 350 млн/мл
Азооспермия	Отсутствие сперматозоидов в эякуляте
Астенозооспермия	Снижение подвижности сперматозоидов
Лейкоцитоспермия	Увеличение числа лейкоцитов в сперме
Некроспермия	Сперматозоиды нежизнеспособны или неподвижны
Тератозооспермия	Более 70% сперматозоидов с аномальной морфологией
Олигоастенотератозооспермия	Сочетание всех 3-х патологических вариантов

4. Селективные исследования спермы. Биохимические тесты — креатинфосфокиназа и реактивный кислород для оценки функции сперматозоидов.

Общеклинические исследования

Рутинные лабораторные исследования: общие анализы мочи и крови, анализ крови на ВИЧ, вирусные гепатиты В и С, сифилис, мазок из уретры и бактериальный посев на флору, исследование секрета предстательной железы и др.

Исследования ПЦР на инфекции, передающиеся половым путем

Инструментальные исследования

УЗИ органов мошонки, предстательной железы, семенных пузырьков.

Дополнительная диагностика

Дополнительная диагностика проводится в соответствии с приведенным алгоритмом.

Показания:

- азооспермия;
- олигоспермия;
- малый объем эякулята;
- проблемы с потенцией.

1. *Исследование гормонов:* фолликулостимулирующий (ФСГ), лютеинизирующий (ЛГ), тестостерон (свободный и общий), пролактин, тироксинсвязывающий глобулин (ТСГ), тиреотропный гормон (ТТГ), тироксин (Т4). При тестикулярной дисфункции уровни ФСГ и ЛГ повышаются. При снижении концентраций ФСГ и ЛГ предполагается гипогонадотропный гипогонадизм. Дисфункция клеток Лейдига характеризуется низким уровнем тестостерона и высоким показателем ЛГ. Повышение содержания пролактина может быть признаком аденомы гипофиза.

2. *Исследование фруктозы в семенной жидкости* (для исключения врожденной агенезии семявыводящих протоков).

3. *Биопсия яичек* (выполняется для дифференциальной диагностики первичной тестикулярной недостаточности или обструкции семявыносящих протоков).

4. *Трансректальное УЗ-исследование* (выполняется при азооспермии и тяжелой олигоспермии при нормальном объеме яичек; патологических данных при пальцевом ректальном исследовании, аномалиях семявыносящего тракта: кисты, дилатация, кальцификаты, аномалии половых органов – гипоспадия).

5. *Вазография* (проводится при обструкции семявыносящего тракта).

Исследование повреждений ДНК в мужских спермиях методом ДНК-комет

ПЕРЕЧЕНЬ НЕОБХОДИМОГО ОБОРУДОВАНИЯ, РЕАКТИВОВ, СРЕДСТВ, ИЗДЕЛИЙ МЕДИЦИНСКОЙ ТЕХНИКИ

Материалы:

Микропробирки «эппендорф» на 0,5 мл.

Микропробирки «эппендорф» на 1,5 мл.

Штативы для микропробирок.

Автоматические пипетки (дозаторы) на 1–10 (или 1–20); 10–100 (или 20–200) и 200–1000 мкл.

Насадки к автоматическим пипеткам.

Цитологические (предметные) стекла 26×76 мм с ровными (отшлифованными) боковыми краями и шероховатым участком для надписей.

Покровные стекла 24×48 (50) мм.

Емкость Коплинга или емкость Шиффердекера, или любая другая стеклянная либо пластиковая емкость, предназначенная для фиксации и окраски цитологических стекол.

Коробки для хранения предметных стекол.

Оборудование:

Водяная баня (температурный режим 30–37°C).

Микроволновая печь.

Шейкер (вортекс) с режимом («touch») («прикосновение»).

Холодильник двухкамерный (камера охлаждения на 4°C и морозильная камера на -20°C).

Твердотельный термостат для микропробирок с диапазоном температур 37–90°C.

Камера для горизонтального электрофореза (емкость рабочей поверхности — не менее 3 предметных стекол размером 26×76 мм).

Источник питания, позволяющий работать со средней силой тока 300 мА.

Флуоресцентный микроскоп с объективом на 40×, окулярами на 10×, фильтром возбуждения 515–560 нм и барьерным фильтром на 590 нм.

Реактивы:

Солевой фосфатный буфер без ионов Ca и Mg (PBS — phosphate buffer saline).

Этиловый спирт 96%.

Бромистый этидий.

Агароза с низкой температурой плавления, 37°C, легкоплавкая агароза, тип А (Low Melting Point Agarose — LMPA).

Агароза с нормальной температурой плавления 80–95°C, тип В (Normal Melting Point Agarose — NMPA).

Натрий хлористый (NaCl).

Натрий гидроксид (NaOH).

Этилендиамин-*N,N,N',N'*-тетрауксусной кислоты динатриевая соль двухводная (EDTA).

Трис основной (Tris basic).

Кислота соляная (HCl).

Тритон X-100 (Triton X-100).

Протеиназа К.

Бидистиллированная вода (H₂O_{bid}).

Стоковые растворы:

5 М NaCl.

10 М NaOH.

0,5 М EDTA, pH = 8.

1 М Трис, pH = 7,5.

20% Тритон X-100.

10 мг/мл протеиназа К.

Все стоковые растворы кроме протеиназы готовятся по стандартным методикам в соответствии с рекомендациями фирм-производителей и хранятся в холодильнике при 4°C в течение 1–2 мес. Стоковый раствор протеиназы К хранится при -20°C в расфасованных пробирках «эппендорф» на 1,5 мл.

Рабочие растворы:

1%-й раствор (w/v) в PBS агарозы с низкой температурой плавления. Хранить в пробирках Эппендорф на 1,5 мл при 4°C. Разогреть при 60–90°C непосредственно перед работой.

0,5%-й раствор (w/v) на бидистиллированной воде агарозы с нормальной температурой плавления. Хранить в термостойкой посуде с закрытым верхом при 4°C. Разогреть в микроволновой печи по мере необходимости.

Лизисный раствор: 2,5 М NaCl, 0,1 М EDTA, 10 мМ Tris, 1% Triton X-100, 0,05 мМ протеиназа К (добавляется последней после 1–2 ч прохождения первого этапа лизиса).

Буфер для электрофореза: 300 мМ NaOH, 1 мМ EDTA, pH ≥ 13.

Буфер для нейтрализации: 0,4 М Tris, pH = 7,4.

Лизисный раствор и буферы должны быть свежеприготовленными.

Подготовка цитологических стекол

Стекла должны быть предварительно обезжирены по стандартным методикам (с использованием 96% этилового спирта) или закуплены в готовом виде, очищенными от жира. Окунуть каждое обезжиренное стекло в горячий 0,5%-й раствор нормальной агарозы, удерживая за шлифованный край для надписей. Вынуть из раствора и в течение 2–3 с дать стечь избытку агарозы. Салфеткой удалить агарозу с нижней части стекла. Положить стекло на горизонтальную поверхность агарозой вверх до полного ее застывания. Пометить простым карандашом поверхность стекла с наслоенной агарозой. Уложить стекла в коробки для хранения и использовать по мере необходимости. Перед началом работы с клетками все стекла должны быть подписаны простым карандашом с присвоением уникального номера.

Схема выполнения основных процедур

Погружение клеток в агарозу и наслаивание на стекла

Необходимое количество клеток — до 500 тыс. на 1 стекло.

1. Разбавить часть спермы в растворе PBS до концентрации 0,1–1 млн клеток/мл (достаточный объем разбавленного раствора — 200–300 мкл).

2. Отобрать 50 мкл разбавленной суспензии клеток в пробирку «эппендорф» на 0,5 мл и добавить 100 мкл 1%-й легкоплавкой агарозы, подогретой до 37°C.

3. Той же насадкой быстро и тщательно смешать агарозу с клеточной суспензией, не допуская образования пузырьков воздуха.

4. Незамедлительно отобрать 100 мкл полученной смеси и осторожно нанести ее на цитологическое стекло, предварительно покрытое нормальной агарозой (см. выше — подготовка цитологических стекол).

5. Быстро и не надавливая накрыть смесь покровным стеклом, дать ей растечься ровным слоем. Положить стекло на лед или в холодильник при 4°C на ровную горизонтальную поверхность.

6. Дать агарозе застыть; при соблюдении температурного режима и концентрации агарозы продолжительность этапа не превышает 4–5 мин.

7. Стянуть покровное стекло большим пальцем руки по наиболее короткой траектории: от одного широкого края стекла к другому.

8. Приготовить 2–3 стекла на 1 донора (повторить процедуры 2–7).

Лизис

1. Поставить стекла с агарозой в емкости Коплинга (или Шиффердекера), заполненные охлажденным до 4°C свежеприготовленным лизисным раствором.

2. Выдержать стекла в лизисном растворе в течение 1–2 ч при 4°C (на льду в холодильнике), предохраняя от попадания яркого света.

3. Добавить к раствору протеиназу К в конечной концентрации 0,05 мМ; хорошо перемешать.

4. Поставить емкости со стеклами на водяную баню, предварительно подогретую до 30°C.

5. Выдержать стекла на водяной бане в течение ночи.

Денатурация ДНК и электрофорез

1. После завершения лизиса вынуть стекла из раствора, поставить вертикально на ребро на фильтровальной бумаге и дать стечь лизисному раствору в течение 1 мин; не позволять стеклам подсыхать.

2. Дополнительно для удаления лизисного раствора можно окунуть стекла в охлажденную дистиллированную воду и дать ей стечь.

3. Плотно уложить стекла в камеру для фореа агарозой вверх, длинной стороной по направлению от катода к аноду и на равном от них удалении (т. е. по центру прохождения электрического поля для достижения его равномерности на всех стеклах); направление укладывания стекол, как и их количество, при каждом исследовании должно быть постоянным.

4. Поставить камеру на лед в холодильнике для поддержания температуры около 4°C; не допускать попадания света в камеру.

5. Осторожно заполнить камеру буфером для электрофореза, охлажденным до 4°C, до полного погружения стекол под раствором (верхний уровень буферного раствора около 0,5 см над стеклами); не допускать всплывания стекол.

6. Выдержать стекла в буферном растворе 10 мин для прохождения процесса денатурации.

7. Подключить камеру к источнику питания; провести форе́з в течение 20 мин при напряжении 0,7–0,8 (максимум 1) В на 1 см расстояния между электродами и силе тока до 300 мА.

8. Отключить источник питания; быстро и осторожно вынуть стекла из буферного раствора на фильтровальную бумагу.

9. Дать стечь буферному раствору; продолжительность не более 1 мин.

Нейтрализация

1. Поставить стекла с агарозой в емкости Коплинга (или Шиффердекера), заполненные охлажденным до 4°C раствором для нейтрализации.

2. Выдержать емкости 5 мин на льду.

3. Слить раствор и повторить с п. 1.

4. Вынуть стекла на фильтровальную бумагу и дать стечь раствору; продолжительность до 1 мин.

Фиксация

1. Погрузить стекла с агарозой в емкости Коплинга (или Шиффердекера), заполненные 96% этиловым спиртом, охлажденным до -20°C.

2. Выдержать емкости в течение 10 мин на льду.

3. Вынуть стекла на фильтровальную бумагу и дать стечь фиксатору.

4. Уложить на ровную поверхность до полного высыхания в течение 1 сут.

Хранение препаратов

После высыхания слоя агарозы с клетками поставить стекла в коробки для хранения до начала микроскопного анализа.

Анализ повреждений ДНК

Нанести на препараты по 1–2 капли бромистого этидия, приготовленного на дистиллированной воде в концентрации 20 мг/мл. Накрыть покровным стеклом, выдержать 2–3 мин и удалить салфеткой избытки красителя. С помощью флуоресцентного микроскопа с использованием 400-кратного увеличения и специальных фильтров (фильтр возбуждения на 515–560 нм и барьерный фильтр на 590 нм) проанализировать на каждом стекле 100 спермиев среднего размера, свободно располагающихся в центре стекла. Не анализировать спермии аномально меньше или больше среднего размера. Исключать из анализа незрелые половые клетки или лейкоциты, отличающиеся от спермиев более компактной упаковкой нуклеотида и, соответственно, имеющие более яркое флуоресцентное свечение (рисунок 1). Избегать большого скопления клеток, а также участков стекла с техническими проблемами (повреждение слоя агарозы, давленные клетки и т. д.).

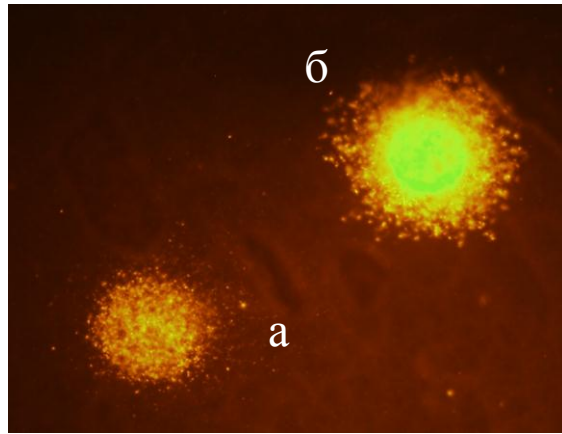


Рисунок 1. — Сперматозоид (а) и незрелая половая клетка или лейкоцит (б) в образце мужской спермы после электрофореза в агарозе и окраски бромистым этидием (обе клетки без повреждений ДНК)

Для визуальной классификации клеток с различной степенью повреждений ДНК использовать подход, разработанный А. Collins с соавт. (Collins et al., 1993; 1994). Все клетки разделять по степени поврежденности на 5 классов (рисунок 2):

Класс 0 (A_0) — нет ДНК, мигрировавшей из ядра клетки и образующей хвост, подобный хвосту кометы.

Класс 1 (A_1) — до 5% ДНК ядра мигрирует в хвост кометы, длина которого составляет до $\frac{1}{2}$ диаметра ядра клетки.

Класс 2 (A_2) — хвост кометы приблизительно равен диаметру ядра, количество ДНК в хвосте около 25%.

Класс 3 (A_3) — около 50% ДНК мигрировало в хвост кометы, хвост кометы больше диаметра ядра.

Класс 4 (A_4) — ядро клетки мелкое, почти вся ДНК в хвосте.

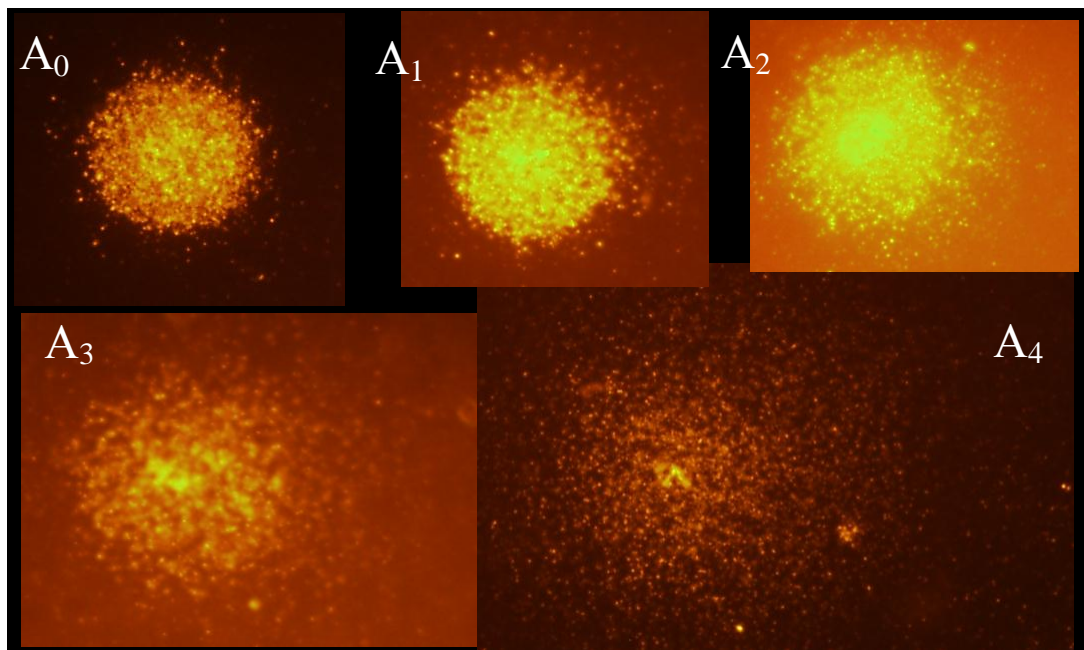


Рисунок 2. — Спермии человека с различным уровнем повреждений ДНК: от класса A_0 до класса A_4

Результаты классификации каждой из 100 проанализированных клеток необходимо регистрировать. Форма регистрации представлена в таблице 2.

Таблица 2. — Форма для заполнения результатов анализа клеток с различными уровнями повреждений ДНК

№№ препаратов	Классы комет					Примечание
	A ₀	A ₁	A ₂	A ₃	A ₄	

Подсчет количества повреждений ДНК

Подсчитать среднее на стекло количество повреждений ДНК, выраженное в условных единицах (усл. ед. или a.u. — arbitrary units) по следующей формуле (Collins et al., 1993; 1994):

$$D = A_1 + 2 \times A_2 + 3 \times A_3 + 4 \times A_4, \quad (1)$$

где D — общее количество повреждений в условных единицах на 100 клеток;
 A — количество клеток с соответствующим классом повреждений ДНК (от A_1 до A_4).

Рассчитать среднее количество повреждений ДНК на 2–3 проанализированных стекла. Показатели нормы находятся в диапазоне 0–22 усл. ед.

Пример 1.

Получены следующие результаты анализа под микроскопом трех препаратов спермиев, полученных от Донора 1:

№№ препаратов	Классы комет					Примечание
	A ₀	A ₁	A ₂	A ₃	A ₄	
1–1	83	16	1	–	–	
1–2	82	15	3	–	–	
1–3	84	13	2	1	–	

Количество повреждений ДНК на препарате под шифром 1–1 составляет:

$$D = A_1 + 2 \times A_2 + 3 \times A_3 + 4 \times A_4 = 16 + 2 \times 1 = 18 \text{ усл. ед.};$$

на препарате под шифром 1–2:

$$D = A_1 + 2 \times A_2 + 3 \times A_3 + 4 \times A_4 = 15 + 2 \times 3 = 21 \text{ усл. ед.}$$

и на последнем препарате:

$$D = A_1 + 2 \times A_2 + 3 \times A_3 + 4 \times A_4 = 13 + 2 \times 2 + 1 \times 3 = 20 \text{ усл. ед.}$$

Среднее количество повреждений ДНК по трем проанализированным препаратам составляет:

$$(18 + 21 + 20) / 3 = 19,7 \text{ усл. ед.}$$

Полученное значение укладывается в диапазон нормы.

Пример 2.

Зарегистрированы следующие результаты микроскопного анализа препаратов спермиев от Донора 2:

№№ препаратов	Классы комет					Примечание
	A ₀	A ₁	A ₂	A ₃	A ₄	
2-1	21	60	14	5	-	
2-2	9	69	21	1	-	
2-3	-	-	-	-	-	<i>Механическое повреждение слоя агарозы (препарат не анализировался)</i>

Количество повреждений ДНК на препарате под шифром 1-1 составляет:

$$D = A_1 + 2 \times A_2 + 3 \times A_3 + 4 \times A_4 = 60 + 2 \times 14 + 3 \times 5 = 103 \text{ усл. ед.};$$

на препарате под шифром 1-2:

$$D = A_1 + 2 \times A_2 + 3 \times A_3 + 4 \times A_4 = 69 + 2 \times 21 + 3 \times 1 = 114 \text{ усл. ед.}$$

Третий препарат не анализировался. Среднее количество повреждений ДНК по двум проанализированным препаратам составляет:

$$(103 + 114) / 2 = \mathbf{108,5 \text{ усл. ед.}}$$

Полученное значение превышает диапазон нормы, свидетельствуя о существенном повреждении ДНК спермиев, и является патологическим.