Нарушение конденсации хроматина сперматозоидов и фрагментация ДНК сперматозоидов: есть ли корреляция?

Е.Е. Брагина^{1,2}, Е.А. Арифюлин¹, Е.М. Лазарева³, М.А. Лелекова⁴, О.Л. Коломиец⁵, А.Г. Чоговадзе⁴,
Т.М. Сорокина², Л.Ф. Курило², В.Ю. Поляков¹

¹ Научно-исследовательский институт физико-химической биологии им. А.Н. Белозерского ФГБОУ ВПО «Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова»; Россия, 119992 Москва, Ленинские горы, 1, стр. 40;

² ФГБНУ «Медико-генетический научный центр»; Россия, 115478 Москва, ул. Москворечье, 1;

³ Биологический факультет ФГБОУ ВПО «Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова»; Россия, 119234 Москва, Ленинские горы, 1, стр. 12;

⁴ ООО «ЦГРМ ИСКЧ», Банк репродуктивных клеток и тканей «Репробанк»; Россия, 119333 Москва, ул. Губкина, 3, корп. 1;

⁵ ФГБУН «Институт общей генетики им. Н.И. Вавилова» РАН; Россия, 119991 ГСП — 1 Москва, ул. Губкина, 3

Контакты: Елизавета Ефимовна Брагина bragor@mail.ru

Введение. В последнее десятилетие появилось понимание двоякой природы повреждения генетического аппарата сперматозоидов: нарушение конденсации хроматина («незрелый» хроматин, НХ), связанное с нарушенной протаминизацией и приводящее к нарушению эпигенетической регуляции раннего эмбриогенеза, и нарушение целостности ДНК сперматозоидов — фрагментация ДНК (ФДС).

Цель исследования — изучение корреляции между нарушением конденсации хроматина сперматозоидов и ФДС.

Материалы и методы. Проводили исследование сперматозоидов 54 фертильных мужчин (1-я группа, контрольная), 46 пациентов с первичным бесплодием (2-я группа) и 111 пациентов, в анамнезе жен которых имели место аномалии беременности либо неудачи применения вспомогательных репродуктивных технологий (ВРТ) — остановка развития эмбриона (3-я группа).

Наличие НХ выявляли методом количественного электронно-микроскопического исследования, ФДС — методом TUNEL. Исследование НХ и ФДС в одном и том же сперматозоиде проводили методом корреляционной микроскопии (TUNEL с последующим ультраструктурным изучением маркированных клеток).

Результаты. Содержание сперматозоидов с НХ статистически достоверно отличалось от контрольной в 3-й группе ($29,26 \pm 13,49$ против $22,43 \pm 9,54$; $p = 0,006$). Содержание НХ во 2-й группе выше, чем в 1-й, но разница статистически недостоверна ($p = 0,061$). Достоверные различия по содержанию сперматозоидов с остаточной цитоплазмой на головке отмечены между группой фертильных мужчин и 2-й и 3-й группами ($p = 0,0001$ и $p = 0,0006$ соответственно) и на шейке ($p = 0,0002$ и $p = 0,0003$ соответственно). Содержание сперматозоидов с ФДС статистически достоверно отличалось от контрольной во 2-й группе ($21,40 \pm 11,88$ против $13,70 \pm 7,00$, $p = 0,03$) и не отличалось в 3-й группе. Очень слабая корреляция между содержанием сперматозоидов с ФДС и сперматозоидов с НХ отмечена во всех 3 группах ($r = 0,18$, $r = 0,33$ и $r = 0,01$ соответственно). Методом корреляционной электронной микроскопии исследовано 46 сперматозоидов, из них 23 с НХ и 23 — с конденсированным хроматином. В 11 из 23 сперматозоидов с НХ выявлена ФДС. В сперматозоидах с конденсированным хроматином ФДС определена в 6 сперматозоидах.

Заключение. ФДС и нарушение конденсации хроматина — в высокой степени независимые параметры, которые должны учитываться при выяснении генезиса бесплодия. НХ чаще обнаруживается в сперматозоидах пациентов, у жен которых в анамнезе — нарушение эмбриогенеза. ФДС чаще выявляется при первичном бесплодии.

Ключевые слова: генезис бесплодия, содержание сперматозоидов, конденсация хроматина, фрагментация ДНК, остаточная цитоплазма, трансмиссионная электронная микроскопия, корреляционная электронная микроскопия

DOI: 10.17650/2070-9781-2017-18-1-48-61

Abnormal chromatin condensation in spermatozoa and DNA fragmentation in spermatozoa: Is there a correlation?

E.E. Bragina^{1,2}, E.A. Arifulin¹, E.M. Lazareva³, M.A. Lelekova⁴, O.L. Kolomiets⁵, A.G. Chogovadze⁴,
T.M. Sorokina², L.F. Kurilo², V.Yu. Polyakov¹

¹A.N. Belozersky Research Institute of Physico-Chemical Biology, Lomonosov Moscow State University; 1—40, Leninskie Gory, Moscow 119992, Russia;

²Research Center of Medical Genetics; 1 Moskvorechye St., Moscow 115478, Russia;

³Biological Faculty, Lomonosov Moscow State University; 1—12, Leninskie Gory, Moscow 119234, Russia;

⁴Regenerative and Genetic Medical Center of the Human Stem Cell Institute, reproductive cell and tissue bank “Reprobank”; 3—1 Gubkin St., Moscow 119333, Russia;

⁵Vavilov Institute of General Genetics, Russian Academy of Sciences; 3 Gubkin St., Moscow 119991 GSP — 1, Russia

Introduction. In the last decade, an understanding of the two-fold nature of genetic apparatus damage in spermatozoa has emerged: abnormal chromatin condensation ("immature" chromatin, ICH) related to defective protamination and leading to altered epigenetic regulation of the early embryogenesis, and disruption of DNA integrity, i. e. DNA fragmentation (DFS).

Objective. Study of the correlation between abnormal chromatin condensation in spermatozoa and DFS.

Materials and methods. The study included spermatozoa of 54 fertile males (1st group, control), 46 patients with primary infertility (2nd group), and 111 patients whose wives had a history of pregnancy abnormalities or failures of the assisted reproductive technology (ART), i. e. arrested embryonic development (3rd group).

Presence of ICH was identified by quantitative electron microscopy, presence of DFS by TUNEL. Study of ICH and DFS in the same spermatozoon was conducted using correlation microscopy (TUNEL with subsequent ultrastructural analysis of the labeled cells).

Results. The number of ICH spermatozoa significantly differed in the 3rd group from the control group (29.26 ± 13.49 vs. 22.43 ± 9.54 ; $p = 0.006$). The number of ICH spermatozoa in the 2nd group was higher than in the control group, but the difference wasn't statistically significant ($p = 0.061$). A significant difference in the number of spermatozoa with residual cytoplasm on the head was observed between the fertile group and 2nd and 3rd groups ($p = 0.0001$ and $p = 0.0006$, respectively) and on the neck ($p = 0.0002$ and $p = 0.0003$, respectively). Number of DFS spermatozoa in the second group significantly differed from the control (21.40 ± 11.88 vs. 13.70 ± 7.00 , $p = 0.03$), but this difference wasn't observed for the 3rd group. A very weak correlation between the number of DFS and ICH spermatozoa was observed in all three groups ($r = 0.18$, $r = 0.33$, and $r = 0.01$, respectively). Forty-six (46) spermatozoa were studied using correlation microscopy, among them 23 were DFS and 23 were ICH. In 11 of 23 HDS spermatozoa DFS was observed. In spermatozoa with condensed chromatin, DFS was identified in 6 spermatozoa.

Conclusion. DFS and abnormal chromatin condensation are highly independent parameters, which should be considered during identification of the cause of infertility. ICH is more frequent in spermatozoa of patients whose wives have a history of embryogenesis abnormalities. DNS is more frequent in primary infertility.

Key words: infertility causes, sperm count, chromatin condensation, DNA fragmentation, residual cytoplasm, transmission electron microscopy, correlated electron microscopy

Введение

Основная функция сперматозоидов — перенос мужского генома в яйцеклетку. У типичного (нормального) сперматозоида имеется сложно устроенный жгутик для движения, акросома, содержащая протеолитические ферменты, обеспечивающие прохождение через оболочки яйцеклетки, и плотный хроматин (ДНК и белки), устойчивый к действию повреждающих факторов при сложном движении через мужские и женские половые пути [1].

Однако исследования, проведенные за последние 20 лет, показали, что сперматозоид не просто осуществляет транспортную функцию. Помимо переноса генетической информации сперматозоиды принимают участие в сингамии (слиянии мужского и женского ядер), активации ооцита, эпигенетической регуляции раннего эмбриогенеза (см. обзоры: [2–4]).

Собственно генетический материал — хроматин, состоящий из ДНК и белков, — локализован в ядре, которое занимает большую часть головки сперматозоида. В отличие от диффузного хроматина соматических клеток, конденсированный хроматин сперматозоидов имеет высокую плотность, которая по крайней мере в 10 раз превышает плотность хроматина соматических клеток [5].

Чтобы достигнуть такой уникальной степени компактизации, ДНК сперматозоидов упаковывается специфическим образом, который значительно отличается от упаковки хроматина соматических клеток. В соматических клетках ДНК упакована в структуры, называемые нуклеосомами. Нуклеосома состоит из двойной

спирали ДНК, обмотанной вокруг специфического комплекса из восьми нуклеосомных гистонов (гистоновый октамер) [6].

Процесс перехода круглых сперматид к зрелым сперматозоидам включает в себя дифференцировку ядра, которое приобретает удлинённую форму и перемещается к переднему полюсу клетки, определяя локализацию акросомы и жгутика [7]. При созревании сперматозоидов происходит ремоделирование хроматина. Соматические гистоны заменяются протаминами на финальной стадии спермиогенеза [8]. Сначала происходит замещение соматических гистонов тестис-специфическими [9]. Гистоны гиперацетилируются на N-конце, затем происходит диссоциация нуклеосом, во время которой фермент топоизомераза II снимает возникшие торзионные напряжения ДНК [10]. Топоизомераза II способна релаксировать сверхспирализованные молекулы ДНК путем внесения двухцепочечных разрывов с последующим лигированием [11]. При нормальном спермиогенезе есть стадия, в которой все сперматиды имеют разрывы ДНК, и эти разрывы не являются маркером апоптоза. Временные разрывы ДНК происходят параллельно с ремоделированием хроматина [12]. На конечной стадии спермиогенеза гистоны заменяются более мелкими белками с высоким положительным зарядом — протаминами, содержащими большое количество аргинина и цистеина (см. обзоры [13, 14]).

Во время прохождения сперматозоидов через эпидидимис происходит формирование дисульфидных мостиков между цистеиновыми остатками протаминов, что увеличивает стабильность ДНК-протаминового

комплекса и морфологически обуславливает формирование плотного конденсированного нуклеопротаминового комплекса в ядре сперматозоидов [15, 16]. Деконденсация хроматина сперматозоидов и формирование нуклеосомной структуры происходит после оплодотворения. Состояние дисульфидных связей важно для процесса деконденсации хроматина, который начинается немедленно после оплодотворения и зависит от окисления дисульфидных связей [17]. Итак, организация хроматина сперматозоидов не только способствует передаче компактно упакованной ДНК в яйцеклетку, но также обеспечивает обратную трансформацию, чтобы генетическая информация была доступна для развивающегося эмбриона [16, 18].

В зрелых сперматозоидах человека 10–15 % ДНК генома остаются свободными от протаминов и сохраняют нуклеосомную структуру [19, 20]. До недавнего времени роль этих остаточных нуклеосом оставалась неясной. В 2010 г. одновременно 3 независимые группы исследователей показали, что остаточные нуклеосомы — не просто случайные остатки неэффективной протаминизации. Распределение генов в протаминизированных и гистоновых (нуклеосомных) районах хроматина подчиняется определенному порядку. Такие «остаточные» нуклеосомы располагаются в промоторах генов, контролирующих ранние стадии развития эмбрионов (например, кластеры НОХ генов), в локусах импринтинговых генов, в генах микроРНК [19, 21, 22].

Таким образом, компактизация протаминизированного хроматина обеспечивает его метаболическую инактивацию, с одной стороны, и механическую и химическую стабильность — с другой, защищая отцовский геном от действия нуклеопротеаз при прохождении сперматозоидов через мужские и женские половые пути и при взаимодействии с ооцитом. «Остаточные» нуклеосомы маркируют гены, кодирующие факторы раннего развития эмбрионов. Нормальная конденсация хроматина является маркером потенциальной способности сперматозоидов образовывать нормально развивающиеся эмбрионы. Доказано, что anomальная (недостаточная) конденсация хроматина вызывает задержку первого цикла клеточных делений и в дальнейшем повреждение эмбриона [23, 24]. Эти повреждения могут приводить к неудачам вспомогательных репродуктивных технологий (ВРТ) [25], к потере беременности на ранних сроках [26, 27].

При нарушении репрограммирования хроматина обнаружено случайное распределение гистонов в геноме сперматозоидов, уменьшение гистоновых модификаций H3K4me и H3K27me в регуляторных участках (промоторах) генов факторов транскрипции и некоторых импринтинговых генов [28], существенных для раннего эмбриогенеза. Электронно-микроскопические исследования позволяют понять, что нарушения протаминизации приводят к нарушению компактизации

хроматина сперматозоидов [29–31]. Показано, что у инфертильных мужчин увеличено соотношение «гистоны/протамины» по сравнению с фертильными [32]. У мужчин с нарушениями фертильности сперматозоиды с нарушением организации хроматина обнаруживаются чаще, чем у фертильных мужчин [33, 34]. Аномальная протаминизация делает сперматозоиды чувствительными к генетическим и эпигенетическим ошибкам [35].

Другой тип нарушений генетического аппарата сперматозоидов — фрагментация ДНК. Получены многочисленные данные о том, что высокое содержание сперматозоидов с фрагментацией ДНК приводит к нарушению фертильности мужчин и представляет угрозу для здоровья потомства. Первые публикации о фрагментации ДНК в сперматозоидах появились в конце 1980-х — начале 1990-х годов [36, 37]. Было показано, что содержание сперматозоидов с фрагментацией ДНК у бесплодных мужчин с нормозооспермией и у пациентов с аномальными показателями спермограммы выше, чем у фертильных мужчин с нормозооспермией [38].

Появились публикации о том, что высокий уровень повреждения ДНК связан с нарушением дробления эмбриона, высокой частотой спонтанных аборт и повторными потерями беременности после ВРТ [39–42].

В последнее десятилетие опубликованы многочисленные исследования, авторы которых пытаются установить корреляцию между фрагментацией ДНК и статусом хроматина [30, 42–46].

В научной литературе встречаются противоречивые утверждения относительно связи между повышенным содержанием сперматозоидов с фрагментацией ДНК в зрелых сперматозоидах и содержанием сперматозоидов с аномальной упаковкой хроматина. Отмечено наличие корреляции [42, 47, 48]. Продемонстрирована и выраженная корреляция между аномальной протаминизацией хроматина и фрагментацией ДНК, вызванной окислительным стрессом [49]. Было высказано предположение, что аномальное ремоделирование является основной причиной нарушения целостности ДНК [34, 50, 51]. С другой стороны, имеются данные о том, что популяция незрелых сперматозоидов не ассоциирована с повышенной фрагментацией ДНК [52, 53]. Отсутствие корреляции между содержанием сперматозоидов с неконденсированным хроматином и фрагментацией ДНК показано у мужчин с тератозооспермией [46].

Расхождение результатов может быть связано как с применением различных методов определения фрагментации ДНК и компактизации хроматина, с одной стороны, так и с разными контингентами пациентов — с другой.

До настоящего времени не установлено, что клетки, содержащие множественные разрывы ДНК, соответствуют тем сперматозоидам, в которых выявляются аномалии

упаковки хроматина. В единичных работах проводили одновременное исследование сперматозоидов на наличие разрывов ДНК и нарушение компактизации хроматина [28, 49, 54]. Совпадение атипии по разрывам ДНК и нарушению протаминизации наблюдали в 85 % сперматозоидов [54]. В одном исследовании выявили высокую степень корреляции ($r = 0,956$) [49]. Показано, что, с одной стороны, окраска анилиновым синим (краситель, выявляющий гистоны) статистически значимо выше в сперматозоидах с фрагментацией ДНК, однако, с другой стороны, сперматозоиды с фрагментацией ДНК могут иметь нормальный гистоновый статус [55].

В настоящей работе мы выявляли нарушение конденсации хроматина сперматозоидов прямым методом — с помощью трансмиссионной электронной микроскопии. Мы показали наличие очень слабой корреляции между нарушением конденсации хроматина сперматозоидов и фрагментацией ДНК. При помощи корреляционного анализа, сочетающего электронную и светооптическую микроскопию, мы впервые продемонстрировали прямым методом наличие разрывов ДНК как в клетках с нарушенной компактизацией хроматина, так и в сперматозоидах с конденсированным хроматином. Согласно нашим данным, нарушение конденсации хроматина сперматозоидов не всегда ведет к появлению разрывов ДНК.

Материалы и методы

Пациенты

Параллельное электронно-микроскопическое исследование сперматозоидов (ЭМИС) и исследование фрагментации ДНК сперматозоидов (ФДС) проводили на образцах эякулята 64 фертильных мужчин, полученных в Репробанке (1-я группа, контрольная), а также на 178 образцах эякулята, полученных за 2015–2016 гг. в Медико-генетическом научном центре и ЗАО «МБЦ Пастер» от пациентов с нарушением фертильности из Москвы и Московской области, обратившихся для проведения спермиологического исследования. У 46 пациентов были жалобы на отсутствие беременности (первичное бесплодие, 2-я группа), у 132 пациентов в анамнезе — аномалии беременности супруги (замершая беременность, спонтанный аборт в первом триместре беременности) либо неудача ВРТ (остановка развития эмбриона при проведении экстракорпорального оплодотворения (ЭКО) / интрацитоплазматической инъекции сперматозоида (ИКСИ)) (3-я группа).

При анализе результатов ЭМИС были исключены результаты исследования образцов спермы 10 фертильных мужчин и 21 пациента с нарушением фертильности при обнаружении агрегатов активированных нейтрофильных лейкоцитов либо большого количества бактериальных микроколоний.

Таким образом, в работу вошли результаты исследования 54 образцов спермы фертильных мужчин

(1-я группа), 46 образцов спермы пациентов с первичным бесплодием (2-я группа) и 111 образцов спермы пациентов, у жен которых в анамнезе аномалии эмбриогенеза (3-я группа).

Все пациенты подписывали информированное согласие на проведение исследования согласно постановлению этического комитета Медико-генетического научного центра. В исследование не включали лиц, у которых концентрация сперматозоидов была <10 млн/мл, пациентов с выявленными инфекциями генитального тракта, пациентов, принимающих препараты, потенциально вредные для сперматогенеза, пациентов с выявленными генетическими аномалиями и пациентов из пар, где у женщины выявлено бесплодие.

Анализ эякулята

Эякулят собирали путем мастурбации после 2–4 дней полового воздержания. После разжижения 0,5 мл каждого образца отбирали для стандартного спермиологического исследования согласно последнему изданию Руководства ВОЗ (2010). Остаток эякулята использовался для трансмиссионной электронной микроскопии (ТЭМ) и исследования фрагментации ДНК методом TUNEL (Transferase mediated dUTP Nick End Labeling).

Трансмиссионная электронная микроскопия

Для ТЭМ образцы эякулята разводили изотоническим раствором NaCl, предварительно нагретым до 37°C , в соотношении 1:10, мягко перемешивали и добавляли 0,2 мл 2,5 % раствора фиксатора (2,5 % раствор глутарового альдегида на 0,1 М какодилатном буфере, pH 7,2). Разведенный эякулят центрифугировали 10 мин при 100 g, к осадку добавляли 2 мл фиксатора. Материал постфиксировали в 1 % осмиевой кислоте и заливали в эпон. Ультратонкие срезы получали на ультрамикротоме UltrCut III (Reichert, Германия) алмазным ножом (Diatome, Швейцария) и изучали в электронном микроскопе JEM 1400 (JEOL, Япония).

Строение головок сперматозоидов оценивали на продольных срезах (не менее 100 клеток). Конденсированный хроматин типичных сперматозоидов визуализируется в виде гомогенной структуры средней электронной плотности (рис. 1). При нарушениях конденсации хроматина в ядрах виден гранулярный, так называемый незрелый хроматин (НХ), в котором просматривается хромонемная структура — фибриллы толщиной 40 нм (рис. 2).

Также оценивали наличие остаточной цитоплазмы на головке и на шейке (цитоплазматические капли на головке и на шейке).

В каждом образце проводили подсчет головок нормальной формы. Толщина ультратонкого среза порядка 200 нм, на него попадала только часть головки сперматозоида. При просмотре и подсчете сперматозоидов предпочтение отдавалось тем клеткам,

Рис. 1. Сперматозоид с конденсированным хроматином

Рис. 2. Сперматозоид с «незрелым» хроматином

которые попадали на срез срединной частью с основанием головки и шейкой. За нормальную форму мы принимали головки с симметричными овальными очертаниями или с овальными очертаниями с заостренным концом, очертания ядра без инвагинаций и выпячиваний, с симметричной акросомой. Не считались нормальными головки, размер которых превышал 5 мкм в длину и 3 мкм в ширину.

Определение фрагментации ДНК в сперматозоидах

Для проведения исследования эякулят разводили в 10 раз изотоническим раствором NaCl, центрифугировали 15 мин при 100 g. Из ресуспендированного в 0,2 мл NaCl осадка сперматозоидов делали мазок на адгезивных стеклах HistoBond (Marienfeld, Германия). Высушенные мазки хранили при -20°C . Перед исследованием мазки фиксировали 15 мин при комнатной температуре 4 % раствором формальдегида на PBS, пермеабелизировали клетки 0,2 % раствором Triton X — 100 на PBS 5 мин при комнатной температуре, раствором протеиназы К (20 мкг/мл) на PBS 10 мин при комнатной температуре, промывали в PBS и дополнительно фиксировали формальдегидом. Для выявления разрывов ДНК использовали набор DeadEnd Fluorimetric

Рис. 3. TUNEL. Зеленая флуоресценция в сперматозоиде с фрагментацией ДНК (а) и сперматозоиды в фазово-контрастном микроскопе (б)

TUNEL system (Promega, США) согласно инструкции производителя. После завершения ферментативной реакции образцы докрашивали флуорохромом DAPI (Sigma, США) (1 мкг/мл) на PBS либо пропидием иодидом (Sigma, США) (1 мкг/мл) и заключали образцы в Moviол (Calbiochem, Великобритания).

Для анализа препаратов и регистрации изображения использовали микроскоп Axiovert 200M (Zeiss, Германия), оснащенный флуоресцентной приставкой и камерой Orca-II ERG — 2 (Hamamatsu, Япония) (размер пикселя $6,45 \times 6,45$ мкм), управляемом программным комплексом AxioVision v4.3. Зоны фрагментации ДНК визуализировались в виде зеленой флуоресценции (рис. 3).

Корреляционный анализ

При проведении корреляционного анализа изучали одни и те же клетки с помощью TUNEL и ТЭМ. Очистку эякулята проводили с помощью набора Pure-Sperm 40/80 (Nidacon, Швеция). Для корреляционного исследования сперматозоиды иммобилизовали на круглых покровных стеклах (Menzel-Glaser, Германия), покрытых полилизинном. В световом микроскопе использовали металлическую камеру для работы с круглыми покровными стеклами (Biopetechs, США).

Для корреляционного светооптического и электронно-микроскопического анализа иммобилизованные на стекле сперматозоиды, окрашенные по методу TUNEL, маркировали при изучении в световом микроскопе и заключали в эпоксидную смолу. Полученные ультратонкие срезы изучали в электронном микроскопе. Изображения, полученные в световом и электронном микроскопах, совмещали методом наложения.

Результаты

Содержание сперматозоидов с нарушением конденсации хроматина в образцах спермы пациентов разных групп

Содержание сперматозоидов с незрелым хроматином статистически достоверно ($p = 0,006$) различалось между 1-й (фертильные мужчины) и 3-й группой (табл. 1). Содержание незрелого хроматина во 2-й группе выше,

Таблица 1. Содержание сперматозоидов с «незрелым» хроматином у фертильных пациентов и при нарушении фертильности

Параметр	Фертильные мужчины/ доноры спермы (1-я группа)	Первичное бесплодие (2-я группа)	Аномалии раннего эмбриогенеза (3-я группа)	p	
				1-я и 2-я	1-я и 3-я
Нормальная форма головки	23,20 ± 6,28	15,80 ± 5,23*	15,80 ± 5,08*	0,0001*	0,0001*
НХ в общей фракции сперматозоидов	22,43 ± 9,54	27,52 ± 10,69	29,26 ± 13,49*	0,061	0,006*
НХ в головках нормальной формы	4,46 ± 3,34	3,93 ± 2,41	3,82 ± 2,87	0,34	0,50
Цитоплазматическая капля на головке	6,20 ± 3,42	10,93 ± 5,49*	9,60 ± 5,38*	0,0001*	0,0006*
Цитоплазматическая капля на шейке	7,33 ± 3,40	12,83 ± 4,85*	10,42 ± 4,06*	0,0002*	0,0003*
Максимальный НХ	51	56	73	—	
Медиана	20	28,5	29		

* Различия статистически достоверны.

чем в 1-й, но разница статистически недостоверна ($p = 0,061$). Максимальное значение содержания сперматозоидов с незрелым хроматином в 1-й группе — 51 %, 2-й группе — 56 %, в 3-й группе — 73 %.

Во 2-й и 3-й группах медиана содержания сперматозоидов составила 29 %, в 1-й группе — 20 %. Максимальное значение с учетом отклонения среднего значения содержания сперматозоидов с НХ в контрольной группе — 32 %, что соответствует нормативным показателям содержания незрелого хроматина [26, 56].

В 1-й группе содержание сперматозоидов с незрелым хроматином более 32 % выявлено в 9 (17 %) из 54 образцов. Во 2-й группе содержание сперматозоидов с незрелым хроматином более 32 % отмечено в 13 (28 %) из 46 образцов. В 3-й группе повышенное содержание сперматозоидов с незрелым хроматином (>32 %) выявлено из 111 в 42 образцах (38 %) (рис. 4).

Рис. 4. Образцы эякулята (%) с повышенным содержанием сперматозоидов с незрелым хроматином. 1-я группа — контрольная, 2-я группа — пациенты с первичным бесплодием, 3-я группа — пациенты, у жен которых в анамнезе нарушение эмбриогенеза (спонтанные аборт, остановка развития эмбриона *in vivo* и *in vitro*)

Достоверные различия между группой фертильных мужчин и 2-й и 3-й группами получены по содержанию сперматозоидов с остаточной цитоплазмой на головке ($p = 0,0001$ и $p = 0,0006$) и на шейке ($p = 0,0002$ и $p = 0,0003$) (см. табл. 1).

Фрагментация ДНК сперматозоидов

Среднее содержание сперматозоидов с фрагментацией ДНК статистически достоверно выше во 2-й группе ($p = 0,03$). Максимальное значение с учетом отклонения среднего значения содержания сперматозоидов с ФДС в 1-й группе — 21 % (табл. 2). При этом максимальное значение содержания сперматозоидов с фрагментацией ДНК практически одинаково во всех группах (58, 51 и 56 % соответственно для 1, 2 и 3-й групп). Медиана — 20,0; 28,5 и 12,4 % соответственно.

Корреляционный анализ фрагментации ДНК

сперматозоидов и нарушения конденсации хроматина

В образцах эякулята фертильных пациентов (1-я группа) обнаружена слабая корреляция между содержанием сперматозоидов с фрагментацией ДНК и сперматозоидов с нарушенной конденсацией хроматина (НХ) ($r = 0,18$). Аналогично, очень слабая корреляция между этими показателями обнаружена в образцах эякулята пациентов 2-й и 3-й групп ($r = 0,33$; $r = 0,01$ соответственно) (рис. 5).

Корреляционная электронная микроскопия

Всего методом корреляционной электронной микроскопии было исследовано 46 сперматозоидов: 23 с НХ и 23 с конденсированным хроматином. Из 23 сперматозоидов с незрелым хроматином фрагментация ДНК выявлена в 11 клетках. В сперматозоидах с конденсированным хроматином фрагментация ДНК определена в 6 сперматозоидах.

На рис. 6, 7 представлены микрофотографии сперматозоидов после двойной обработки — реакции TUNEL

Таблица 2. Содержание сперматозоидов с фрагментацией ДНК у фертильных пациентов и при нарушении фертильности

Параметр	Фертильные мужчины/ доноры спермы (1-я группа)	Первичное бесплодие (2-я группа)	Аномалии раннего эмбриогенеза (3-я группа)	P	
				1-я и 2-я	1-я и 3-я
Фрагментация ДНК	13,70 ± 7,00	21,40 ± 11,88*	14,27 ± 6,70	0,03	0,73
Максимум	58	56	61	—	
Медиана	20	28,5	12,4		

*Различия статистически достоверны.

Рис. 5. Слабая корреляция между содержанием сперматозоидов с НХ и сперматозоидов с ФДС в 1-й, контрольной, группе ($r = 0,18$)

Рис. 6. Корреляционная электронная микроскопия. Клетки 1–3 с конденсированным хроматином, клетка 4 – с незрелым хроматином. На врезке видно, что при проведении TUNEL ФДС выявляется в клетке 2 с конденсированным хроматином (зеленая флуоресценция, докрашено DAPI)

и на ультратонких срезах в трансмиссионном электронном микроскопе. Видны сперматозоиды с конденсированным хроматином и с НХ, недостаточно конденсированным. Достаточно жесткие обработки для выявления фрагментации ДНК привели к разрушению мембранных структур акросом и жгутиков, однако ядра с хроматином сохранили морфологию. На рис. 6 фрагментация ДНК выявлена в 1 сперматозоиде с компактным

Рис. 7. Электронная микроскопия: а – корреляционная; б – трансмиссионная (сперматозоид с незрелым хроматином); в – после проведения TUNEL зоны фрагментации ДНК (зеленая флуоресценция, докрашено пропидий йодидом)

зрелым хроматином, в то время как в 2 сперматозоидах с компактным хроматином и в 1 сперматозоиде с НХ разрывы ДНК не обнаруживаются. На рис. 7 представлен сперматозоид с НХ, в котором выявляются разрывы ДНК.

Обсуждение

С развитием методов ВРТ, особенно ИКСИ, стало появляться все больше доказательств, что основные параметры спермограммы – количество, подвижность и морфология сперматозоидов – не всегда являются индикаторами статуса фертильности мужчины. При одних и тех же показателях спермограммы наблюдаются разные результаты как ВРТ, так и естественной беременности, что заставляет искать более чувствительные тесты для идентификации фертилизационного потенциала [57–58]. Нормальная морфология сперматозоида еще не является гарантией нормального фертилизационного потенциала. В морфологически нормальных сперматозоидах выявляют различные нарушения состояния хроматина и/или хромосом [59–61].

Для индикации компактизации хроматина используют флуорохромы. Акридин оранжевый определяет тиол-дисульфидный статус клеточного ядра [62] и меняет цвет с красного на зеленый по мере созревания сперматозоидов [63]. Широко используется анилиновый синий, окрашивающий гистоны [64]. Хромомицин АЗ относится к природным антибиотикам и связывается с Г-Ц участками ДНК, отражая статус протаминизации [65, 66]. Существующие в настоящее время модели, объясняющие действие хромомицина АЗ, утверждают,

что он индуцирует изменения конформации ДНК (см. обзор [67]).

Большая часть исследований по определению статуса хроматина выполнена этими методами. В настоящей работе был использован метод ультраструктурного исследования, который позволяет визуально определять степень конденсации хроматина. Насколько возможно сравнивать результаты, полученные с помощью ЭМИС и традиционных методов окрашивания сперматозоидов?

НХ, выявляемый в эякулированных сперматозоидах, стали называть незрелым именно потому, что его морфология идентична таковой поздних удлинённых сперматид [68, 69]. У млекопитающих при созревании сперматозоидов хромонемная структура (фибриллы толщиной около 40–50 нм) выявляется в поздних сперматидеях при наличии большого количества гистонов. По мере уменьшения количества гистонов и протаминизации фибриллы хроматин приобретает компактную консистенцию, в которой фибриллы становятся неразличимы [15]. Компактный хроматин связан с минимальными количествами гистона H2A и H4 [70]. У отдельных видов членистоногих *Dekapoda*, у которых хроматин имеет диффузную структуру, в ядрах обнаруживается большое количество гистонов [70]. Прямая корреляция между окраской хромомицином АЗ и ультраструктурным обнаружением сперматозоидов с НХ была продемонстрирована при исследовании образцов эякулята инфертильных пациентов [31].

До внедрения ВРТ основными показателями фертилизационного потенциала спермы считалось количество сперматозоидов, их подвижность и содержание сперматозоидов нормальной (типичной) морфологии). В 1990 годах возник интерес к третичной структуре нуклеопротеинов ядер сперматозоидов [71, 72]. В настоящее время уже не возникает сомнения, что сперматозоиды играют большую роль на ранних этапах эмбриогенеза. Качество ранних этапов дробления определяется отцовским эффектом [24, 73]. Структура конденсированного хроматина и правильная протаминизация обуславливает эпигенетическую регуляцию раннего эмбриогенеза [28]. Соответственно, нарушение протаминизации приводит к аномалиям беременности и неудачам ВРТ [4, 23, 24, 74, 75]. Аналогичные данные получены на мышинной модели [76]. Однако не все так однозначно, приводятся и противоположные результаты: отсутствие корреляции между протаминизацией и исходом ВРТ [45].

Отсутствие обширных рандомизированных исследований влияния нарушения компактизации хроматина на репродукцию не позволяет включать этот показатель в стандартную оценку фертилизационного потенциала сперматозоидов, однако есть работы, в которых определены показатели атипичности структуры хроматина в группах фертильных мужчин. Показано, что

у фертильных мужчин содержание сперматозоидов с незрелым хроматином не превышает 30 % [26, 53, 69, 72].

Мы провели количественный ультраструктурный анализ эякулята 54 доноров спермы фертильных мужчин. Пациентов с нарушением фертильности мы разделили на 2 группы — идиопатическое первичное бесплодие (отсутствие зачатия более года) и пациенты, у жен которых в анамнезе — нарушения беременности на ранних сроках либо неудача ВРТ (остановка развития эмбриона). Статистически достоверно количество сперматозоидов с головками нормальной формы ожидало было выше в группе фертильных пациентов по сравнению с обеими группами с нарушением фертильности ($23,20 \pm 6,28$ % против $15,80 \pm 5,23$ % и $15,80 \pm 5,08$ %; $p = 0,0001$). По содержанию сперматозоидов с НХ статистически достоверные отличия от контрольной группы выявлены в группе пациентов с нарушениями эмбриогенеза ($22,43 \pm 9,54$ % против $29,26 \pm 13,49$ %; $p = 0,006$). При первичном бесплодии различия не столь значительны и не являются статистически достоверными ($27,52 \pm 10,69$; $p = 0,061$). Если ориентироваться на максимальное среднее значение содержания сперматозоидов с НХ у доноров, то нормативный показатель содержания в эякуляте сперматозоидов с НХ — 32 %.

Максимальная частота выявления сперматозоидов с повышенным содержанием НХ обнаружена нами в группе пациентов с нарушением эмбриогенеза — в 42 (38 %) из 111 образцов спермы (максимальное значение содержания сперматозоидов с НХ — 73 %). В группе фертильных мужчин у 9 (17 %) из 54 пациентов содержание сперматозоидов с НХ превысило 32 % (максимальное значение — 51 %). В группе с первичным бесплодием превышение нормативных показателей определено у 13 (28 %) из 46 (максимальное значение — 56 %). Эти данные позволяют сделать заключение, что нарушение конденсации хроматина может служить предиктивным показателем аномалий развития эмбриона как *in vivo*, так и *in vitro*. Причем негативные последствия нарушения компактизации проявляются в раннее время после оплодотворения [77], приводя к раннему эмбриональному аресту [78] и спонтанным абортam [27, 79].

В то же время несомненно, что это не единственный показатель состояния сперматозоидов, оказывающий влияние на эмбриогенез. У фертильных мужчин, в эякуляте которых повышено содержание сперматозоидов с НХ, содержание сперматозоидов с нормальной формой головки — не менее 20 %. У пациентов с нарушениями фертильности при повышении содержания сперматозоидов с НХ нормальных головок значительно меньше. Кроме того, вероятно, играет роль и цитоплазматическая зрелость сперматозоидов: мы обнаружили, что содержание сперматозоидов с остаточной цитоплазмой на головке и на шейке в группе фертильных мужчин статистически достоверно меньше,

чем при первичном бесплодии и при нарушении эмбриогенеза. Незрелые сперматозоиды с остаточной цитоплазмой обладают меньшим связыванием с гиалуроновой кислотой [80] и не способны связываться с *zona pellucida* [81]. По-видимому, состояние хроматина должно быть в сочетании с другими формами атипичии для отрицательного результата репродукции.

Сведения о роли компактизации хроматина в развитии инфертильности относительно мало известны широкому кругу клиницистов, занимающихся проблемами репродукции. Значительно большее внимание привлекает исследование целостности молекул ДНК сперматозоидов — фрагментации ДНК. Для определения ФДС предлагается использование тестов, как прямых, определяющих непосредственно места разрыва ДНК, так и опосредованных, которые определяют чувствительность ДНК к денатурации. Исторически первым использовался непрямой тест SCSA (sperm chromatin structure assay) [82]. К непрямым тестам относятся COMET, позволяющий определять разрывы ДНК в индивидуальных сперматозоидах, дисперсионный тест (ГалоСперм).

Наиболее распространен прямой метод выявления ФДС TUNEL. Метод основан на маркировке флуоресцентным дезоксиуридином свободных двухцепочечных концов ДНК с применением фермента концевой дезоксинуклеотидил трансферазы (terminal deoxynucleotidyl transferase, TdT). Несмотря на то что этот метод считается золотым стандартом для тестирования ФДС [83], строгая стандартизация его выполнения отсутствует. Не определены нормативные показатели для ФДС как для TUNEL, так и для других методов, кроме SCSA, что затрудняет межлабораторные сравнения и является причиной возможных изменений нормативных показателей в лабораториях [84].

Получены огромное количество данных о влиянии ФДС на репродукцию как *in vivo*, так и *in vitro*. Повышенное содержание сперматозоидов с ФДС было продемонстрировано с использованием различных методов [85–87]. Многочисленные наблюдения подчеркивают риск использования сперматозоидов с ФДС для последующих поколений — в том числе риск онкологических заболеваний и врожденных дефектов [88]. На животных моделях показано, что ИКСИ с использованием сперматозоидов с фрагментацией ДНК приводит к высокому риску генетических заболеваний и выраженной патологии [89].

С другой стороны, показано, что уровень ФДС не влияет на развитие бластомеров: не обнаружено статистически достоверных различий по частоте оплодотворения, дроблению и качеству эмбрионов в группе пациентов с высоким и низким содержанием сперматозоидов с ФДС, определяемой по дисперсионному тесту [90]. Имеются также противоречия в исследованиях, посвященных влиянию ФДС на исход ЭКО/ИКСИ,

оставляя сомнения в необходимости определения этого параметра у пар, готовящихся к ВРТ [91, 92].

Эти расхождения отражают вариабельность как используемых методов оценки, так и типа нарушений хроматина. Попытки метаанализа данных о значении измерения ФДС в репродукции показывают, что однозначного ответа дать нельзя, результаты весьма противоречивы: нет данных о предиктивности теста, не подтверждаются данные о преимуществе ИКСИ перед ЭКО при повышенной фрагментации ДНК [84, 93–96]. Авторы отмечают низкое качество рандомизированных исследований и считают, что рекомендовать тест для универсального использования рано: есть работы, в которых не найдено различий исхода ВРТ и беременности при различиях в содержании ФДС, исследованы небольшие гетерогенные популяции, исследования проводятся разными методами и различаются по дизайну экспериментов. Только в единичных работах учитывается такой важный фактор, как компетенция ооцитов и их способность репарировать разрывы ДНК [97]. Хотя важность определения фрагментации ДНК была представлена в руководстве Европейского общества репродукции человека и эмбриологии (European Society of Human Reproduction and Embryology, ESHRE) 2015 г. [98] и Руководстве Американского общества репродуктивной медицины (American Society for Reproductive Medicine, ASRM) [99], вопрос о целесообразности включения исследования ФДС в стандартную схему обследования при бесплодии как дополнение спермограммы обсуждается и не решен окончательно. Рекомендуется проведение дальнейших исследований, так как данных недостаточно для однозначных выводов.

Важнейшим моментом, ограничивающим широкое использование измерения ФДС в практике, является отсутствие нормативных показателей. В 2003–2006 гг. в ряде работ было показано, что у доноров спермы содержание сперматозоидов с ФДС не превышало 15–20 % [100–104]. В последней из цитированных работ значение индекса ФДС определено $13,1 \pm 7,3$ %. Наши данные, полученные методом TUNEL при исследовании спермы фертильных мужчин, полностью совпадают с этими результатами — $13,7 \pm 7,0$ %. Однако в группе фертильных мужчин в 6 из 54 (11 %) случаев наблюдалось превышение максимума средних показателей. Наши результаты позволяют определить нормативные показатели содержания сперматозоидов с ФДС как 20 %. По-видимому, эти цифры нуждаются в уточнениях, так как в цитированных выше работах и в настоящем исследовании рассматривалась относительно небольшая выборка фертильных мужчин.

Анализ результатов исследования ФДС различается во 2-й и 3-й группах пациентов с различным анамнезом. Показатели ФДС в группе пациентов с первичным бесплодием (2-я группа) статистически значимо отличались от таковых фертильных мужчин — $21,40 \pm 11,88$ ($p = 0,03$).

При аномалиях эмбриогенеза (3-я группа) не было различий по содержанию сперматозоидов с ФДС с контрольной группой — среднее значение $14,27 \pm 6,70$. В то же время следует отметить, что в нашем исследовании группа пациентов с первичным бесплодием была самой малочисленной, это отражает реальную ситуацию: на исследование структуры хроматина и ФДС клиницисты предпочитают направлять пациентов с неудачами ВРТ либо аномалиями беременности. Обнаруженная корреляция между результатами внутриматочной инсеминации и уровнем ФДС (см. обзор [105]) подтверждает роль ФДС в отсутствии оплодотворения.

В последнее десятилетие появилось понимание двоякой природы повреждения генетического аппарата сперматозоидов: нарушение конденсации хроматина, связанное с нарушенной протаминизацией и приводящее к нарушению эпигенетической регуляции раннего эмбриогенеза [28], и нарушение целостности ДНК сперматозоидов — фрагментация ДНК (см. обзор [106]). В связи с этим возник интерес к вопросу корреляции этих типов атипии. Многочисленные исследования, в которых результат ремоделирования хроматина определяли окраской хромомицином АЗ либо анилиновым синим, а ФДС — с помощью COMET, SCSA или TUNEL, демонстрировали наличие корреляции между этими процессами [42, 43, 45]. В отличие от соматических клеток, в сперматозоидах ФДС не является показателем апоптоза [107]. Наличие корреляции ФДС и незавершенным ремоделированием хроматина позволило предполагать, что именно незавершенное ремоделирование — основной источник возникновения разрывов ДНК сперматозоидов [50, 108, 109].

Наши данные не совсем согласуются с результатами цитированных выше работ. Мы смотрели корреляцию между содержанием сперматозоидов с НХ в эякуляте фертильных мужчин, и пациентов с различным анамнезом бесплодия (с первичным бесплодием и пациентов, у жен которых в анамнезе нарушение эмбриогенеза). Во всех 3 группах обнаружена очень слабая корреляция ($r = 0,18$, $r = 0,33$ и $r = 0,01$ соответственно). Наши данные совпадают с результатами ряда исследований, в которых также не было выявлено значительной корреляции между протаминизацией, остаточными гистонами и ФДС [52, 53, 110, 111]. Эти данные подтверждены исследованием конкретных сперматозоидов. Корреляционная электронная микроскопия позволяет на одних и тех же клетках смотреть и конденсацию хроматина, и ФДС. Мы исследовали сперматозоиды в электронном микроскопе после изучения в люминесцентном микроскопе ре-

зультатов TUNEL на этих же клетках. ФДС может обнаруживаться как в сперматозоидах с НХ, так и в сперматозоидах с конденсированным хроматином нормальной морфологии. Соответственно, отсутствие ФДС мы обнаруживали в сперматозоидах как с неконденсированным, так и с конденсированным хроматином.

Исходя из полученных результатов, можно сделать заключение, что ФДС и нарушение конденсации хроматина — параметры независимые в высокой степени, но не тотально. Нарушенная конденсация не всегда является причиной ФДС, но связь все-таки прослеживается. Скорее всего, ФДС имеет мультифакториальную природу, у 1 пациента разные механизмы возникновения ФДС могут сосуществовать, приводя к различным сочетаниям с атипией структуры хроматина.

По этиологии ФДС обсуждается 3 основные гипотезы: возникновение разрывов ДНК в результате нарушения ремоделирования хроматина в спермиогенезе [107, 112]; ФДС как результат апоптоза, который включается в тестикулярной ткани (абортивный апоптоз) [113] или начинается после спермиации [114]; действие активных форм кислорода, которые могут влиять на сперматозоиды как в семенных канальцах, так и посттестикулярно [115, 116].

Можно предположить, что нарушение конденсации хроматина обеспечивает доступность ДНК для действия активных форм кислорода, приводя к ФДС. Разрывы ДНК в сперматозоидах с плотным конденсированным хроматином могут быть результатом нарушения ремоделирования хроматина.

Предположение о двоякой природе нарушений имеет значение для определения тактики терапии. Большое количество клинических исследований посвящено изучению влияния антиоксидантной терапии при повышенном содержании сперматозоидов с ФДС (см. обзоры [96, 117]). Антиоксидантная терапия действительно снижает содержание сперматозоидов с ФДС, но данные о достижении клинической беременности далеко не всегда совпадают с данными о нормализации показателей фрагментации ДНК в сперматозоидах. На наш взгляд, заслуживает внимания точка зрения, что более продуктивным может быть подход, позволяющий достичь равновесного состояния генетического аппарата сперматозоидов — нормализации и третичной структуры хроматина, и целостности ДНК как для достижения естественной беременности, так и перед применением ВРТ [118, 119].

Исследование выполнено за счет гранта РНФ (проект № 14–50–00029) и гранта РФФИ № 16–04–01447.

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

1. Zamboni L. Sperm structure and its relevance to infertility. An electron microscopic study. *Arch Pathol Lab Med* 1992;116(4):325–44.
2. Gannon J.R., Emery B.R., Jenkins T.G., Carrell D.T. The sperm epigenome: implications for the embryo. *Adv Exp Med Biol* 2014;791:53–66.
3. Carrell D.T. Epigenetics of the male gamete. *Fertil Steril* 2012;97(2):267–74.
4. Castillo J., Estanyol J.M., Ballescà J.L., Oliva R. Human sperm chromatin epigenetic potential: genomics, proteomics, and male infertility. *Asian J Androl* 2015;17(4):601–9.
5. Braun R.E. Packaging paternal chromosomes with protamine. *Nature Genetics* 2001;28:10–2.
6. Георгиев Г.П., Ченцов Ю.С. О структуре клеточного ядра (экспериментальное электронно-микроскопическое исследование изолированных ядер). Докл. АН СССР 1960;132:199–202. [Georgiev G.P., Chentsov Yu.S. On the structure of cell nuclei: Experimental electron microscopic investigation of isolated nuclei. *Doklady Akademii nauk SSSR = Proceedings of the USSR Academy of Sciences* 1960;132:199–202. (In Russ.)].
7. Kierszenbaum A.L., Tres L.L. The acrosome – acroplaxome – manchette complex and the shaping of the spermatid head. *Arch. Histol Cytol* 2004;67:271–84.
8. Green G.R., Balhorn R., Poccia D.L., Hecht N.B. Synthesis and processing of mammalian protamines and transition proteins. *Mol Reprod Dev* 1994;37:255–63.
9. Govin J., Caron C., Rousseaux S. et al. Testis-specific histone H3 expression in somatic cells. *Trends Biochem Sci* 2005;30:357–9.
10. McPherson S., Longo F.J., Longo F.J. Chromatin structure-function alterations during mammalian spermatogenesis: DNA nicking and repair in elongating spermatids. *Eur J Histochem* 1993;37:109–28.
11. Коничев А.С., Севастьянова Г.А. Молекулярная биология. М.: ИЦ «Академия», 2012. [Konichev A.S., Sevastyanova G.A. *Molecular biology*. Moscow: IC «Akademiy», 2012. (In Russ.)].
12. Marcon L., Boissonneault G. Transient DNA strand breaks during mouse and human spermiogenesis new insights in stage specificity and link to chromatin remodeling. *Biol Reprod* 2004;70:910–8.
13. Oliva R. Protamines and male infertility. *Hum Reprod Update* 2006;12(4):417–35.
14. Castillo J., Amaral A., Oliva R. Sperm nuclear proteome and its epigenetic potential. *Andrology* 2014;2(3):326–38.
15. Prigent Y., Muller S., Dadoune J.P. Immunoelectron microscopical distribution of histones H2B and H3 and protamines during human spermiogenesis. *Mol Hum Reprod* 1996;2(12):929–235.
16. Dadoune J.P. Expression of mammalian spermatozoal nucleoproteins. *Microsc Res Tech* 2003;61:56–75.
17. Love C.C., Kenney R. Scrotal heat stress induces altered sperm chromatin structure associated with a decrease in protamine disulfide bonding in the stallion. *Biol Reprod* 1999;60:615–20.
18. D'Occhio M.J., Hengstberger K.J., Johnston S.D. Biology of sperm chromatin structure and relationship to male fertility and embryonic survival. *Anim Reprod Sci* 2007;101(1–2):1–17.
19. Brykczynska U., Hisano M., Erkek S. et al. Repressive and active histone methylation mark distinct promoters in human and mouse spermatozoa. *Nat Struct Mol Biol* 2010;17(6):679–87.
20. Miller D., Brinkworth M., Iles D. Paternal DNA packaging in spermatozoa: more than the sum of its parts? DNA, histones, protamines and epigenetics. *Reproduction* 2010;139(2):287–301.
21. Hammoud S.S., Nix D.A., Zhang H. et al. Distinctive chromatin in human sperm packages genes for embryo development. *Nature* 2009;23;460(7254):473–78.
22. Arpanahi A., Brinkworth M., Iles D. et al. Endonuclease-sensitive regions of human spermatozoal chromatin are highly enriched in promoter and CTCF binding sequences. *Genome Res* 2009;19:1338–49.
23. Rousseaux S., Reynoird N., Escoffier E. et al. Epigenetic reprogramming of the male genome during gametogenesis and in the zygote. *Reproductive BioMedicine Online* 2008;16:492–503.
24. Ward W.S. Function of sperm chromatin structural elements in fertilization and development. *Mol Hum Reprod* 2010;16:30–6.
25. Małgorzata K., Depa-Martynów M., Butowska W. et al. Human spermatozoa ultrastructure assessment in the infertility treatment by assisted reproduction technique. *Arch Androl* 2007;53(6):297–302.
26. Бочарова Е.Н., Брагина Е.Е., Гусак Ю.К. Количественное ультраструктурное исследование сперматозоидов человека при нарушениях фертильности. Вестник новых медицинских технологий 2007;24(4):199–201. [Bocharova E.N., Bragina E.E., Gusak Yu.K. Quantitative ultrastructural research of spermatozoon from patients with fertility infringement. *Vestnik novikh meditsinskikh tekhnologiy = Journal of New Medical Technologies* 2007;24(4):199–201. (In Russ.)].
27. Talebi A.R., Vahidi S., Aflatoonian A. et al. Cytochemical evaluation of sperm chromatin and DNA integrity in couples with unexplained recurrent spontaneous abortions. *Andrologia* 2012;44 Suppl 1:462–70.
28. Hammoud S.S., Nix D.A., Hammoud A.O. et al. Genome-wide analysis identifies changes in histone retention and epigenetic modifications at developmental and imprinted gene loci in the sperm of infertile men. *Hum Reprod* 2011;26:2558–69.
29. Арифудин Е.А., Брагина Е.Е., Замятнина В.А. и др. Компактизация ДНК в сперматозоидах человека. I. Динамика изменений компактизации нуклеогистонного и нуклеопротаминного хроматина в дифференцирующихся сперматидях. Онтогенез 2012;(2):143–53. [Arifudin E.A., Bragina E.E., Zamyatnina V.A. et al. Chromatin folding in human spermatozoa. I. Dynamics of chromatin remodeling in differentiating human spermatids. *Ontogenez = Russian Journal of Developmental Biology* 2012;(2):143–53. (In Russ.)].
30. Manochantr S., Chiamchanya C., Sobhon P. Relationship between chromatin condensation, DNA integrity and quality of ejaculated spermatozoa from infertile men. *Andrologia* 2012;44(3):187–99.
31. Iranpour F.G., Nasr-Esfahani M.H., Valojerdi M.R., al-Taraihi T.M. Chromomycin A3 staining as a useful tool for evaluation of male fertility. *J Assist Reprod Genet* 2000;17(1):60–6.
32. Zini A., Gabriel M.S., Zhang X. The histone to protamine ratio in human spermatozoa: comparative study of whole and processed semen. *Fertil Steril* 2007;87(1):217–19.
33. Foresta C., Zorzi M., Rossato M., Varotto A. Sperm nuclear instability and staining with aniline blue: abnormal persistence of histones in spermatozoa in infertile men. *Int J Androl* 1992;15(4):330–7.
34. Bianchi P.G., Manicardi G.C., Bizzaro D. et al. Effect of deoxyribonucleic acid protamination on fluorochrome staining and in situ nick-translation of murine and human mature spermatozoa. *Biol Reprod* 1993;49:1083–88.
35. Montjean D., Zini A., Ravel C. et al. Sperm global DNA methylation level: association with semen parameters and

- genome integrity. *Andrology* 2015;3(2):235–40.
36. Singh N.P., Danner D.B., Tice R.R. et al. Abundant alkali-sensitive sites in DNA of human and mouse sperm. *Exp Cell Res* 1989;184(2):461–70.
37. Gorczyca W., Traganos F., Jesionowska H., Darzynkiewicz Z. Presence of DNA strand breaks and increased sensitivity of DNA in situ to denaturation in abnormal human sperm cells: analogy to apoptosis of somatic cells. *Exp Cell Res* 1993;207(1):202–5.
38. Varghese A.C., Bragais F.M., Mukhopadhyay D. et al. Human sperm DNA integrity in normal and abnormal semen samples and its correlation with sperm characteristics. *Andrologia* 2009;41(4):207–15.
39. Ahmadi A., Ng S.C. Fertilizing ability of DNA-damaged spermatozoa. *J Exp Zool* 1999;284:696–704.
40. Benchaib M., Braun V., Lornage J. et al. Sperm DNA fragmentation decreases the pregnancy rate in an assisted reproductive technique. *Hum Reprod* 2003;18:1023–8.
41. Seli E., Gargner D.K., Schoolcraft W.B. Extent of nuclear DNA damage in ejaculated spermatozoa impacts on blastocyst development after in vitro fertilization. *Fertil Steril* 2004;82:378–83.
42. Simon L., Liu L., Murphy K. et al. Comparative analysis of three sperm DNA damage assays and sperm nuclear protein content in couples undergoing assisted reproduction treatment. *Hum Reprod* 2014;29(5):904–17.
43. Hamidi J., Frainais C., Amar E. et al. A double-blinded comparison of in situ TUNEL and aniline blue versus flow cytometry acridine orange for the determination of sperm DNA fragmentation and nucleus decondensation state index. *Zygote* 2015;23(4):556–62.
44. Manicardi G.C., Bianchi P.G., Pantano S. et al. Presence of endogenous nicks in DNA of ejaculated human spermatozoa and its relationship to chromomycin A3 accessibility. *Biol Reprod* 1995;52(4):864–7.
45. Simon L., Castillo J., Oliva R., Lewis S.E. Relationships between human sperm protamines, DNA damage and assisted reproduction outcomes. *Reprod Biomed Online* 2011;23(6):724–34.
46. Skowronek F., Casanova G., Alciaturi J. et al. DNA sperm damage correlates with nuclear ultrastructural sperm defects in teratozoospermic men. *Andrologia* 2012;44(1):59–65.
47. Irvine D.S., Twigg J.P., Gordon E.L. et al. DNA integrity in human spermatozoa: relationships with semen quality. *J Androl* 2000;21:33–44.
48. Mantas D., Angelopoulou R., Msaouel P. et al. Evaluation of sperm chromatin quality and screening of Y chromosome microdeletions in Greek males with severe oligozoospermia. *Arch Androl* 2007;53:5–8.
49. De Iuliis G.N., Thomson L.K., Mitchell L.A. et al. DNA damage in human spermatozoa is highly correlated with the efficiency of chromatin remodeling and the formation of 8-hydroxy— deoxyguanosine, a marker of oxidative stress. *Biol Reprod* 2009;81(3):517–24.
50. Aoki V.W., Emery B.R., Liu L., Carrell D.T. Protamine levels vary between individual sperm cells of infertile human males and correlate with viability and DNA integrity. *J Androl* 2006;27:890–8.
51. Zini A., Bielecki R., Phang D., Zenzes M.T. Correlations between two markers of sperm DNA integrity, DNA denaturation and DNA fragmentation, in fertile and infertile men. *Fertil Steril* 2001;75:674–7.
52. Virro M.R., Larson-Cook K.L., Evenson D.P. Sperm chromatin structure assay(scsa) parameters are related to fertilization, blastocyst development, and ongoing pregnancy in vitro fertilization and intracytoplasmic sperm injection cycles. *Fertil Steril* 2004;81:1289–95.
53. Wyrobek A.J., Eskenazi B., Young S. et al. Advancing age has differential effects on DNA damage, chromatin integrity, gene mutations, and aneuploidies in sperm. *Proc Natl Acad Sci USA* 2006;103:9601–6.
54. Sati L., Ovari L., Bennett D. et al. Double probing of human spermatozoa for persistent histones, surplus cytoplasm, apoptosis and DNA fragmentation. *Reprod Biomed Online* 2008;16(4):570–9.
55. Muratori M., Tamburrino L., Marchiani S. et al. Investigation on the Origin of Sperm DNA Fragmentation: Role of Apoptosis, Immaturity and Oxidative Stress. *Mol Med* 2015;21:109–22.
56. Брагина Е.Е., Бочарова Е.Н. Количественное электронно-микроскопическое исследование сперматозоидов при диагностике мужского бесплодия. *Андрология и генитальная хирургия* 2014;(1):41–50. [Bragina Y.Y., Bocharova Y.N. Quantitative electron microscopic examination of sperm for male infertility diagnosis. *Andrologiya i genitalnaya khirurgiya = Andrology and Genital Surgery* 2014;(1):41–50. (In Russ.)].
57. Guzik D.S., Overstreet J.W., Factor-Litvak P. et al. National Cooperative Reproductive Medicine Network. Sperm morphology, motility, and concentration in fertile and infertile men. *N Engl J Med* 2001;345:1388–93.
58. Sakkas D., Tomlinson M. Assessment of sperm competence. *Semin Reprod Med* 2000;18:133–9.
59. Avendano C., Franchi A., Duran H., Oehninger S. DNA fragmentation of normal spermatozoa negatively impacts embryo quality and intracytoplasmic sperm injection outcome. *Fertil Steril* 2010;94:549–57.
60. Abu D.A., Franken D.R., Hoffman B., Henkel R. Sequential analysis of sperm functional aspects involved in fertilisation: a pilot study. *Andrologia* 2012;44(Suppl 1):175–81.
61. Boitrelle F., Pagnier M., Athiel Y. et al. A human morphologically normal spermatozoon may have noncondensed chromatin. *Andrologia* 2015;47(8):879–86.
62. Lewis J.D., Song Y., de Jong M.E. et al. A walk through vertebrate and invertebrate protamines. *Chromosoma* 1999;111:473–82.
63. Corzett M., Mazrimas J., Balhorn R. Protamine 1: protamine 2 stoichiometry in the sperm of eutherian mammals. *Mol Reprod Dev* 2002;61:519–27.
64. Ozmen B., Koutlaki N., Yousry M. et al. DNA damage of human spermatozoa in assisted reproduction: origins, diagnosis, impacts and safety. *Reprod Biomed Online* 2007;14:384–95.
65. Agarwal A., Said Tamer M. Role of sperm chromatin abnormalities and DNA damage in male infertility. *Hum Reprod Update* 2003;9:331–45.
66. Tarozzi N., Bizzaro D., Flamigni C., Borini A. Clinical relevance of sperm DNA damage in assisted reproduction. *Reprod Biomed Online* 2007;14:746–57.
67. Manicardi G.C., Bizzaro D., Sakkas D. Basic and Clinical Aspects of Sperm Chromomycin A3 Assay. In: Zini A., Agarwal A. (Ed.). *Sperm Chromatin biological and clinical application in male infertility and assisted reproduction*. New York: Springer, 2011. Pp. 171–179.
68. Baccetti B., Bergamini M., Bernieri G. et al. Submicroscopic mathematical evaluation of spermatozoa in assisted reproduction. 4. The bovine fertilization (Notulae seminologicae 10). *J Submicrosc Cytol Pathol* 1997;29(4):563–82.
69. Bartoov B., Eltes F., Reichart M. et al. Quantitative ultramorphological analysis of human sperm: fifteen years of experience in the diagnosis and management of male factor infertility. *Arch Androl* 1999;43(1):13–25.
70. Zhang Z.H., Mu S.M., Guo M.S. et al. Dynamics of histone H2A, H4 and H51ph during spermatogenesis with a focus on chromatin condensation and maturity of spermatozoa. *Sci Rep* 2016;28:25089.
71. Auger J., Mesbah M., Huber C., Dadoune J.P. Aniline blue staining as a marker of sperm chromatin defects associated with different semen

- characteristics discriminates between proven fertile and suspected infertile men. *Int J Androl* 1990;13:452–62.
72. Sakkas D., Urner F., Bianchi P.G. et al. Sperm chromatin anomalies can influence decondensation after intracytoplasmic sperm injection. *Hum Reprod* 1996;11(4):837–43.
 73. Eid L.N., Lorton S.P., Parrish J.J. Paternal influence on S-phase in the first cell cycle of the bovine embryo. *Biol Reprod* 1994;51:1232–7.
 74. Zalenskaya I.A., Bradbury E.M., Zalensky A.O. Chromatin structure of telomere domain in human sperm. *Biochem Biophys Res Comm* 2000;279:213–8.
 75. Puri D., Dhawan J., Mishra R.K. The paternal hidden agenda: Epigenetic inheritance through sperm chromatin. *Epigenetics* 2010;5:386–91.
 76. Ihara M., Meyer-Ficca M.L., Leu N.A. et al. Paternal poly(ADP ribose) metabolism modulates retention of inheritable sperm histones and early embryonic gene expression. *PLoS Genet* 2014;10: e1004317.
 77. Junca A., Gonzalez Marti B., Tosti E. et al. Sperm nucleus decondensation, hyaluronic acid(HA) binding and oocyte activation capacity: different markers of sperm immaturity? Case reports. *J Assist Reprod Genet* 2012;29:353–5.
 78. Dattilo M., Cornet D., Amar E. et al. The importance of the one carbon cycle nutritional support in human male fertility: a preliminary clinical report. *Reprod Biol Endocrinol* 2014;12:71.
 79. Kazerooni T., Asadi N., Jadid L. et al. Evaluation of sperm's chromatin quality with acridine orange test, chromomycin A3 and aniline blue staining in couples with unexplained recurrent abortion. *J Assist Reprod Genet* 2009;26:591–6.
 80. Huszar G., Ozenci C.C., Cayli S. et al. Hyaluronic acid binding by human spermatozoa indicates cellular maturity, viability, and unreacted acrosomal status. *Fertil Steril* 2003;79(3):1616–24.
 81. Huszar G., Sbracia M., Vigue L. et al. Sperm plasma membrane remodeling during spermiogenetic maturation in men: relationship among plasma membrane beta 1,4-galactosyltransferase, cytoplasmic creatine phosphokinase, and creatine phosphokinase isoform ratios. *Biol Reprod* 1997;56:1020–4.
 82. Evenson D.P., Jost L.K., 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.
 83. Sakkas D., Alvarez J.G. Sperm DNA fragmentation: mechanisms of origin, impact on reproductive outcome, and analysis. *Fertil Steril* 2010;93:1027–36.
 84. Agarwal A., Majzoub A., Esteves S.C. et al. Clinical utility of sperm DNA fragmentation testing: practice recommendations based on clinical scenarios. *Transl Androl Urol* 2016;5(6):935–50.
 85. Agarwal A., Varghese, A. C., Sharma R.K. Markers of oxidative stress and sperm chromatin integrity. *Methods Mol Biol* 2009;590:377–402.
 86. Barratt L.R., Aitken R.J., Björndahl L. et al. Sperm DNA: organization, protection and vulnerability: from basic science to clinical applications – a position report. *Hum Reprod* 2010;25:824–38.
 87. Zini A., Sigman M. Are tests of sperm DNA damage clinically useful? pros and cons. *J Androl* 2009;30(3):219–29.
 88. Davies M.J., Moore V.M., Willson K.J. et al. Reproductive technologies and the risk of birth defects. *New Engl J Med* 2012;366:1803–13.
 89. Fernández-Gonzalez R., Moreira P.N., Pérez-Crespo M. et al. Long-term effects of mouse intracytoplasmic sperm injection with DNA-fragmented sperm on health and behavior of adult offspring. *Biol Reprod* 2008;78:761–72.
 90. Haghpanah T., Salehi M., Ghaffari Novin M. et al. Does sperm DNA fragmentation affect the developmental potential and the incidence of apoptosis following blastomere biopsy? *Syst Biol Reprod Med* 2016;62(1):1–10.
 91. Zini A., Boman J.M., Belzile E., Ciampi A. Sperm DNA damage is associated with an increased risk of pregnancy loss after IVF and ICSI: systematic review and metaanalysis. *Hum Reprod* 2008;23:2663–8.
 92. Collins J.A., Barnhart K.T., Schlegel P.N. Do sperm DNA integrity tests predict pregnancy with in vitro fertilization? *Fertil Steril* 2008;89:823–31.
 93. Robinson L., Gallos I.D., Conner S.J. et al. The effect of sperm DNA fragmentation on miscarriage rates: a systematic review and meta-analysis. *Hum Reprod* 2012;27(10):2908–17.
 94. Osman A., Alsomait H., Seshadri S. et al. The effect of sperm DNA fragmentation on live birth rate after IVF or ICSI: a systematic review and meta-analysis. *Reprod Biomed Online* 2015;30:120–7.
 95. Cissen M., Wely M.V., 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.
 96. Showell M.G., Mackenzie-Proctor R., Brown J. et al. Antioxidants for male subfertility. *Cochrane Database Syst Rev* 2014;(12):CD007411.
 97. Menezes Y. Jr, Russo G., Tosti E. et al. Expression profile of genes coding for DNA repair in human oocytes using pangenomic microarrays, with a special focus on ROS linked decays. *J Assist Reprod Genet* 2007;24:513–20.
 98. Jungwirth A., Diemer T., Dohle G.R. et al. Guidelines on Male Infertility. European Association of Urology 2015. 42 p.
 99. Jarow J., Sigman M., Kolettis P.N. et al. The optimal evaluation of the infertile male: best practice statement reviewed and validity confirmed 2011. Available at: <https://www.auanet.org/education/guidelines/maleinfertility-d.cfm>.
 100. Chohan K.R., Griffin J.T., Lafromboise M. et al. Comparison of chromatin assays for DNA fragmentation evaluation in human sperm. *J Androl* 2006;27(1):53–9.
 101. Smith R., Kaune H., Parodi D. et al. Increased sperm DNA damage in patients with varicocele: relationship with seminal oxidative stress. *Hum Reprod* 2006;21(4):986–93.
 102. Tesarik J., Greco E., Mendoza C. Late, but not early, paternal effect on human embryo development is related to sperm DNA fragmentation. *Hum Reprod* 2004;19(3):611–5.
 103. Carrell D.T., Liu L., Peterson C.M. et al. Sperm DNA fragmentation is increased in couples with unexplained recurrent pregnancy loss. *Arch Androl* 2003;49(1):49–55.
 104. Sergerie M., Laforest G., Bujan L. et al. Sperm DNA fragmentation: threshold value in male fertility. *Hum Reprod* 2005;20(12):3446–51.
 105. Tamburrino L., Marchiani S., Montoya M. et al. Mechanisms and clinical correlates of sperm DNA damage. *Asian J Androl* 2012;14(1):24–31.
 106. Руднева С.А., Брагина Е.Е., Арифудин Е.А. и др. Фрагментация ДНК в сперматозоидах и ее взаимосвязь с нарушением сперматогенеза. *Андрология и генитальная хирургия* 2014;(4):26–33. [Rudneva S.A., Bragina E.E., Arifudin E.A. et al. DNA fragmentation in spermatozoa and its relationship with impaired spermatogenesis. *Andrologiya i genitalnaya khirurgiya = Andrology and Genital Surgery* 2014;(4):26–33. (In Russ.)].
 107. Sakkas D., Moffatt O., Manicardi G.C. et al. Nature of DNA damage in ejaculated human spermatozoa and the possible involvement of apoptosis. *Biol Reprod* 2002;66:1061–7.
 108. Cho C., Willis W.D., Goulding E.H. et al. Haploinsufficiency of protamine-1 or -2 causes infertility in mice. *Nat Genet* 2001;8:82–6.
 109. Aoki V.W., Moskovtsev S.I., Willis J. et al. DNA integrity is compromised in protamine-deficient human sperm. *J Androl* 2005;26:741–8.

110. Henkel R., Hoogendijk C.F., Bouic P.J., Kruger T.F. TUNEL assay and SCSA determine different aspects of sperm DNA damage. *Andrologia* 2010;42(5): 305–13.
111. Sharbatoghli M., Rezazadeh Valojerdi M., Bahadori M.H. et al. The Relationship between Seminal Melatonin with Sperm Parameters, DNA Fragmentation and Nuclear Maturity in Intra-Cytoplasmic Sperm Injection Candidates. *Cell J* 2015;17(3):547–53.
112. Shamsi M.B., Kumar R., Dada R. Evaluation of nuclear DNA damage in human spermatozoa in men opting for assisted reproduction. *Indian J Med Res* 2008;127:1115–23.
113. Sakkas D., Mariethoz E., Manicardi G. et al. Origin of DNA damage in ejaculated human spermatozoa. *Rev Reprod* 1999;4:31–7.
114. Mahfouz R.Z., Sharma R.K., Poenicke K. et al. Evaluation of poly (ADP-ribose) polymerase cleavage (cPARP) in ejaculated human sperm fractions after induction of apoptosis. *Fertil Steril* 2009;91(5 Suppl): 2210–20.
115. Venkatesh S., Riyaz A.M., Shamsi M.B. et al. Clinical significance of reactive oxygen species in semen of infertile Indian men. *Andrologia* 2009;41:251–56.
116. Moskovtsev S.I., Jarvi K., Mullen J.B. et al. Testicular spermatozoa have statistically significantly lower DNA damage compared with ejaculated spermatozoa in patients with unsuccessful oral antioxidant treatment. *Fertil Steril* 2010;93(4):1142–6.
117. Gharagozloo P., Aitken R.J. The role of sperm oxidative stress in male infertility and the significance of oral antioxidant therapy. *Hum Reprod* 2011;26(7):1628–40.
118. Menezo Y., Hazout A., Panteix G. et al. Antioxidants to reduce sperm DNA fragmentation: an unexpected adverse effect. *Reprod Biomed Online* 2007;14:418–21.
119. Menezo I., Evenson D., Cohen M., Dale B. Effect of Antioxidants on Sperm Genetic Damage. In: E. Baldi, M. Muratori(eds.), *Genetic Damage in Human Spermatozoa*, *Advances in Experimental Medicine and Biology*. New York: Springer Science+Business Media, 2014. P. 173–189.