

© Е. М. Шильникова^{1,2},
И. Д. Федорова¹, А. М. Гзгзян¹

¹ ФГБУ «НИИАГ им. Д. О. Отта» СЗО
РАМН, Санкт-Петербург

² ФГБУ ВПО «Санкт-Петербургский
государственный университет»

АНАЛИЗ ДОЛИ СПЕРМАТОЗОИДОВ С ФРАГМЕНТИРОВАННОЙ ДНК В ЭЯКУЛЯТЕ ПАЦИЕНТОВ С НАРУШЕНИЕМ ФЕРТИЛЬНОСТИ

УДК: 616.697:616-003.262/.263-07

■ Методом флуоресцентного мечения одно- и двунитевых разрывов ДНК (TUNEL) проанализирована доля сперматозоидов с фрагментированной ДНК в образцах эякулята доноров спермы и у пациентов с нарушением фертильности. Доля сперматозоидов с фрагментированной ДНК в эякуляте пациентов со структурными перестройками кариотипа была повышена. Корреляции между долей сперматозоидов с фрагментированной ДНК и параметрами спермиологического анализа не выявлено. Показано наличие прямой линейной корреляции между долей сперматозоидов с фрагментированной ДНК и сперматозоидов с вакуолизированной формой головки. Для грушевидных, аморфных форм головок сперматозоидов или головок с патологией акросомы такой корреляции не выявлено.

■ **Ключевые слова:** сперматозоиды человека; фрагментация ДНК; параметры спермограммы; морфологические формы головок сперматозоидов.

ВВЕДЕНИЕ

Среди супружеских пар детородного возраста частота бесплодия во многих странах, в том числе и в России, достигает 15 %, то есть каждый 5–6 брак является бесплодным [1,8]. Этиологическим фактором отсутствия беременности более чем в 50 % случаев являются нарушения мужской репродуктивной функции, при этом на долю изолированного мужского фактора приходится 25–30 %, в 20–30 % случаев заболевания выявлены у обоих супругов (сочетанный фактор) [24].

В настоящее время одними из основных критериев оценки мужской репродуктивной функции являются показатели параметров спермиологического анализа (концентрация, подвижность и доля морфологически нормальных форм сперматозоидов в эякуляте). Однако в 10–15 % случаев этиология супружеского бесплодия неизвестна (идиопатическое бесплодие) [24], что делает необходимым дальнейшее развитие лабораторных методов диагностики мужского бесплодия и оценки качества эякулята. Так, дискутируется введение в практику как одного из способов, оценивающих мужской репродуктивный потенциал, различных методов оценки целостности ДНК сперматозоида. Фрагментация ДНК сперматозоида связана с появлением одно- и двунитевых разрывов молекулы ДНК, некоторое количество которых необходимо для нормального сперматогенеза [32]. Однако при различных нарушениях сперматогенеза степень повреждения ДНК увеличивается. Описано 6 основных причин, приводящих к возникновению разрывов в ДНК: 1. Апоптоз в процессе сперматогенеза, 2. Разрывы нитей ДНК в процессе компактизации хроматина в спермиогенезе, 3. Фрагментация ДНК в процессе транспорта сперматозоидов по семенным канальцам и придатку яичка, 4. Фрагментация ДНК, вызванная активностью каспаз и эндонуклеаз, 5. Действие химио- и радиотерапии, 6. Действие факторов окружающей среды [5, 21].

Исследования показывают, что нарушение целостности ДНК сперматозоида не сказывается на его оплодотворяющей способности, однако является одной из основных причин, приводящих к остановке развития и элиминации эмбриона на ранних этапах эмбриогенеза [19, 18]. Также нарушение целостности ДНК сперматозоида оказывает влияние на первые деления дробления эмбриона, имплантацию и течение беременности [22]. Анализ современных данных позволяет связывать до 20 % случаев идиопатического бесплодия с нарушением целостности ДНК сперматозоидов [25].

Одним из методов оценки целостности ДНК сперматозоида является TUNEL (Terminal deoxynucleotidil transferase (TdT)-mediated dUTP Nick and Labelling) [22]. Данный метод позволяет детектировать одно- и двунитевые разрывы ДНК с сохранением морфологии сперматозоида, исключая,

таким образом, из анализа клетки сперматогенного ряда и соматические клетки. Целью данной работы являлась оценка доли сперматозоидов с фрагментированной ДНК у доноров спермы и пациентов с нарушением фертильности. Исследована взаимосвязь между долей сперматозоидов с фрагментированной ДНК и параметрами спермограммы (концентрацией, подвижностью, долей морфологически нормальных форм сперматозоидов в эякуляте), а также морфологическими особенностями головки сперматозоида.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

Материалом для исследования служили образцы периферической крови и эякуляты от 40 пациентов с нарушением фертильности, а также образцы эякулята 7 доноров спермы.

Для всех пациентов и доноров спермы проводили стандартный цитогенетический анализ кариотипа на метафазных пластинках из ФГА-стимулированных лимфоцитов периферической крови с последующим дифференциальным окрашиванием (QFH) [2].

По результатам кариотипирования выделены две группы: пациенты с нормальным мужским кариотипом (46, XY) и полиморфными вариантами хромосом 1, 3, 22 ($n=36$) и носители структурных перестроек кариотипа ($n=4$): 46, XY, t(6;19)(p22;q12), 46, XY, t(1;5)(p22;q32), t(6;12)(q15;q21), 46, XY, t(2;3)(q33;q29), 46, XY, der(13;14)(q10;q10).

Для всех пациентов был проведен стандартный спермиологический анализ [33]. Снижение показателей концентрации, подвижности и доли морфологически нормальных форм сперматозоидов в эякуляте — олигоастенотератозооспермия — наблюдалось у 6 из 40 пациентов (15%): 4 (66,7%) пациентов с нормальным кариотипом и 2 — с аномалиями кариотипа (33,3%). У 14 (35%) пациентов отмечалось снижение доли подвижных и морфологически нормальных форм сперматозоидов — астенотератозооспермия. Тератозооспермия (снижение доли морфологически нормальных форм сперматозоидов в эякуляте) была обнаружена у 20 пациентов (50%): 18 (90%) пациентов с нормальным кариотипом и 2 (10%) — с аномалиями кариотипа.

В качестве материала при проведении оценки целостности ДНК для доноров спермы использовали криоконсервированный эякулят, центрифугированный в градиенте плотности силиконовых частиц. Здоровье, возраст и параметры спермограммы доноров удовлетворяют требованиям, предъявляемых донорам согласно ВОЗ [33].

Цитологические препараты сперматозоидов из эякулята готовили по стандартной методике [2]. Для определения доли сперматозоидов с фрагментированной ДНК в исследуемых образцах эякулята применяли метод TUNEL с использованием dUTP, конъюгированных с флуоресцентным красителем — флуоресцеином. Флуоресцентное мечение одно- и двунитевых разрывов ДНК проводили с использованием готовых наборов фирмы Roche согласно методике, рекомендуемой фирмой производителем (Roche, Germany). Для каждого анализируемого образца было посчитано 2000 сперматозоидов. Анализ распределения флуоресцентного сигнала в головках сперматозоидов проводили на микроскопах DNLS (Leica, Германия), Axioskop (Opton, Германия), оснащенных блоками светофильтров для ФИТЦ, ТРИТЦ, ДАПИ и йодистого пропидия, Axiostar plus (Zeiss, Германия).

Статистический анализ данных проводили на ПК с помощью программ StatGraphics, GraphPad Software.

РЕЗУЛЬТАТЫ

По результатам исследования в контрольную группу вошли 5 образцов эякулята, в которых доля сперматозоидов с фрагментированной ДНК варьировала от 0,15% до 0,35%, составляя в среднем $0,26 \pm 0,09\%$, статистически достоверно не отличавшихся друг от друга ($p=0,3422$). В эякуляте двух доноров спермы доля сперматозоидов с фрагментированной ДНК составила 0,85% и 1,05% и была выше соответствующих показателей других доноров спермы ($p=0,0004$), вследствие чего данные доноры в контрольную группу включены не были (табл. 1).

Доля сперматозоидов с фрагментированной ДНК в группе пациентов, в конституциональном кариотипе которых были выявлены перестройки с участием аутосом ($n=4$), варьировала от 0,45% до 1,4%, составляя в среднем $0,91 \pm 0,53\%$ и была выше, чем в контрольной группе ($p=0,0294$) (табл. 1).

В эякуляте пациентов с олигоастенотератозооспермией доля сперматозоидов с фрагментированной ДНК варьировала от 0,1% до 1,4%, составляя в среднем $0,9 \pm 0,58\%$ и была выше, чем в контрольной группе ($p=0,0372$). Доля сперматозоидов с фрагментированной ДНК в эякуляте пациентов с астенотератозооспермией варьировала от 0,25% до 2,2%, составляя в среднем $1,12 \pm 0,56\%$ и была выше, чем в контрольной группе ($p=0,0041$). В группе пациентов с тератозооспермией доля сперматозоидов с фрагментированной ДНК варьировала в пределах от 0,1% до 2,9%, составляя в среднем

Таблица 1

Доля сперматозоидов с фрагментированной ДНК у пациентов с различной фертильностью

Номер пациента	Кариотип	Результаты спермограммы	Доля сперматозоидов с фрагментацией ДНК (%) (на 2000 сперматозоидов)
Донор 1	46,XY	H	0,15
Донор 2	46,XY	H	0,20
Донор 3	46,XY	H	0,25
Донор 4	46,XY	H	0,35
Донор 5	46,XY	H	0,35
Донор 6	46,XY	H	0,85
Донор 7	46,XY	H	1,05
7	46,XY,der(13;14)(q10;q10)	OAT	1,4
9	46,XY,t(2;3)(q33;q29)	OAT	1,35
131	46,XY,t(1;5)(p22;q32),t(6;12)(q15;q21)	T	0,45
143	46,XY,t(6;19)(p22;q12)	T	0,45
127	46,XY	OAT	0,35
150	46,XY	OAT	0,8
152	46,XY	OAT	1,4
153	46,XY	OAT	0,1
10	46,XY	AT	1,3
12	46,XY,3qh+	AT	1,9
14	46,XY,22ps+	AT	1,2
15	46,XY	AT	2,2
16	46,XY	AT	1
17	46,XY	AT	1,6
18	46,XY	AT	1,05
19	46,XY	AT	0,85
20	46,XY	AT	0,65
21	46,XY,1qh+	AT	1,55
26	46,XY	AT	0,25
27	46,XY	AT	0,8
128	46,XY	AT	0,75
149	46,XY	AT	0,4
13	46,XY	T	0,85
22	46,XY	T	0,1
24	46,XY	T	0,5
28	46,XY	T	0,25
129	46,XY	T	0,4
130	46,XY	T	1
132	46,XY	T	0,9
133	46,XY	T	0,4
135	46,XY	T	2,9
139	46,XY	T	0,25
140	46,XY	T	0,45
141	46,XY	T	0,5
142	46,XY	T	0,45
144	46,XY	T	1,7
145	46,XY	T	0,85
146	46,XY	T	0,2
147	46,XY	T	0,35
148	46,XY	T	0,3

H — нормозооспермия; OAT — олигоастенотератозооспермия; AT — астенотератозооспермия; T — тератозооспермия

$0,66 \pm 0,64$ и не отличалась от контрольной группы ($p=0,1809$) (табл. 1).

Между параметрами спермограммы: концентрацией, долей подвижных и морфологически нормальных форм сперматозоидов статистически достоверной корреляции обнаружено не было.

Наряду со стандартной морфологической оценкой был проведен учет морфологических особенностей головки сперматозоидов. Согласно строгому критерию Крюгера [16] выделяли следующие морфологические формы головок сперматозоидов: нормальная, с небольшой патологией, большая, сигарообразная, грушевидная, вакуолизирующая, аморфная, двойная, точечная, округлая и патологии акросомы. В качестве анализируемых выбраны следующие формы патологии: вакуолизирующая головка, грушевидная головка и головка с уменьшением размеров акросомы. Для анализа взаимосвязи между данными патологиями головки и целостностью генетического материала был проведен регрессионный анализ.

Между долей вакуолизуемых форм головок сперматозоидов в эякуляте и долей сперматозоидов с фрагментированной ДНК была выявлена прямая линейная корреляция средней силы ($r=0,44$; $p=0,0049$) (рис. 1).

При анализе взаимосвязи между долей грушевидных, аморфных форм головок сперматозоидов, а также между долей сперматозоидов с аномалиями акросомы в эякуляте и долей сперматозоидов с фрагментированной ДНК статистически достоверной корреляции обнаружено не было.

ОБСУЖДЕНИЕ

Исследования последних лет, посвященные анализу частоты фрагментации ДНК в сперматозоидах у мужчин с нормозооспермией, определяют эту величину в достаточно широких пределах от 0% и до 25% [30, 11, 10, 15, 28]. Наблюдаемые колебания можно объяснить некоторыми объективными и субъективными причинами: различной национально-этнической принадлежностью доноров спермы, различными требованиями, предъявляемыми к их здоровью и, возможно, различным сроком полового воздержания до проведения анализа, а так же отличиями методов (TUNEL, SCSA, CometAssay) или применением различных критериев анализа. Так, при использовании метода TUNEL и микроскопического анализа особую сложность представляет собой выбор базового уровня флуоресценции головки сперматозоида. Тем не менее, большинство авторов, использую-

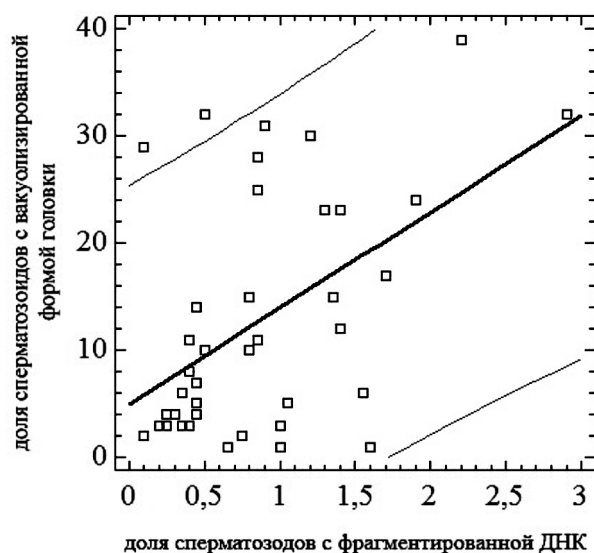


Рис. 1. Эмпирические данные и линия регрессии доли сперматозоидов с вакуолизированной формой головки по доле сперматозоидов с фрагментированной ДНК. Коэффициент корреляции Спирмена 0,44; ($p=0,0049$)

щих метод TUNEL и микроскопический анализ, оценивают долю сперматозоидов с фрагментированной ДНК в эякуляте пациентов с нормозооспермией в пределах от 0,1% и до 4% [7, 31, 30, 28], что вполне соответствует нашим результатам ($0,26 \pm 0,09\%$).

В настоящем исследовании в образцах эякулята двух из семи доноров спермы доля сперматозоидов с фрагментированной ДНК составила 0,85% и 1,05% (доноры 6 и 7) и была достоверно выше соответствующих показателей у других доноров спермы, составляющих контрольную группу (табл. 1). В современной практике положительное решение о возможном донорстве эякулята принимается на основании результатов спермограммы и результатов обследования здоровья мужчины. Однако требования к отцовству предполагаемого донора не являются обязательными. Между тем, показано, что у 20% мужчин с нормальными показателями спермограммы доля сперматозоидов с фрагментированной ДНК в эякуляте повышена [4, 26]. Поэтому целесообразным может быть введение дополнительных методов оценки репродуктивного потенциала мужчины, участвующего в программе донорства.

По мнению некоторых исследователей высокий уровень сперматозоидов с фрагментированной ДНК связан с наличием хромосомных перестроек в конституциональном кариотипе пациента [6, 29, 14]. Действительно, доля сперматозоидов в эякуляте пациентов с кариотипами 46, XY, der (13;14) (q10; q10) и 46, XY, t (2;3) (q33; q29) составила 1,4% и 1,35%, соответ-

ственно, и превышала показатели контрольной группы ($0,26 \pm 0,09\%$) (табл. 1). Однако у двух других пациентов этой группы с кариотипами 46, XY, t (6;19) (p22; q12) и 46, XY, t (1;5) (p22; q32), t (6;12) (q15; q21) повышение частоты сперматозоидов с фрагментацией ДНК было недостоверным (0,45%). Следует отметить, что значительное снижение стандартных параметров спермограммы (концентрации, доли подвижных и морфологически нормальных форм сперматозоидов) наблюдается у пациентов с повышенной долей сперматозоидов с фрагментированной ДНК. У пациентов с незначительным повышением сперматозоидов с поврежденной ДНК отмечена только легкая степень тератозооспермии. Действительно, некоторые исследователи находят прямую зависимость между долей сперматозоидов с поврежденной ДНК и ухудшением параметров спермиологического анализа [19]. В других работах такой зависимости обнаружено не было [27].

Таким образом, на сегодняшний день не существует единого мнения по данному вопросу. Возможно, перестройки конституционального кариотипа связаны с увеличением доли сперматозоидов с фрагментированной ДНК лишь опосредованно, нарушая процессы мейоза и спермиогенеза. Однако у пациента с двумя реципрокными транслокациями в кариотипе 46, XY, t (1;5) (p22; q32), t (6;12) (q15; q21) параметры спермограммы и доля сперматозоидов с фрагментированной ДНК незначительно отличались от контрольной группы. Поэтому для детального анализа данного вопроса требуются дальнейшие исследования.

В нашем исследовании у пациентов с нормальным кариотипом корреляции между показателями спермиологического анализа и долей сперматозоидов с фрагментированной ДНК не выявлено. Тем не менее, в группах ОАТ и АТ доля сперматозоидов с фрагментированной ДНК была выше относительно показателей контрольной группы. Следовательно, увеличение доли сперматозоидов с фрагментированной ДНК свойственно как пациентам с нарушениями кариотипа, так и пациентам с нормальным кариотипом и сниженными показателями параметров спермограммы.

У пациентов с тератозооспермией доля сперматозоидов с фрагментированной ДНК статистически достоверно не отличалась от соответствующих показателей контрольной группы, однако, отмечался широкий разброс значений. По мнению ряда авторов, при тератозооспермии наблюдается увеличение доли сперматозоидов с фрагментированной ДНК [13, 12, 28].

Однако особого внимания заслуживают преобладающие в эякуляте морфологические формы головок сперматозоидов, такие как, например, макроцефалические (увеличение размеров головки сперматозоида), вакуолизованные, грушевидные или другие [5, 13, 12]. Тем более, существуют данные о корреляции между некоторыми формами головок сперматозоидов и частотой гетероплоидии [17, 20, 3]. Можно предполагать, что наличие вакуолей в головке сперматозоида является следствием повреждения ДНК сперматозоида. Действительно, в нашем исследовании мы обнаружили положительную корреляцию между долей сперматозоидов с фрагментированной ДНК и долей вакуолизованных форм сперматозоидов ($r=0,44$; $P=0,0049$), что подтверждается данными других исследователей [16]. По-видимому, увеличение сперматозоидов с вакуолизованной формой головки является маркером нарушения целостности ДНК сперматозоидов.

Глобозооспермия, характеризующаяся преобладанием в эякуляте сперматозоидов с отсутствием или значительным уменьшением размеров акросомы, также является часто встречающейся формой патологии головки сперматозоида. Эта форма патологии вызывает особый интерес, в связи с тем, что сперматозоиды с подобными морфологическими отклонениями не способны к оплодотворению и обладают сниженным потенциалом активации ооцита. В нашем исследовании корреляции между долей сперматозоидов с аномалией акросомы и долей сперматозоидов с фрагментированной ДНК выявлено не было. Действительно, по некоторым данным такой зависимости не обнаруживается [9]. Хотя, по мнению ряда авторов, нарушение некоторых процессов, происходящих в сперматогенезе, например, протаминирования ДНК [12], приводит не только к появлению брешей в ДНК, но также влияет на изменение морфологии созревающего сперматозоида, в частности, нарушает целостность акросомы [30]. Также не было обнаружено взаимосвязи между формированием грушевидной или аморфных головок и повышением доли сперматозоидов с фрагментированной ДНК.

В заключение следует подчеркнуть, что существующие в настоящее время в клинической практике методы оценки репродуктивного потенциала мужчины имеют определенные ограничения. С помощью стандартных методов оценки фертильности не всегда точно можно определить причину бесплодия, в особенности у тех пациентов, которые имеют нормальные показатели спермиологического анализа. Развитие

и внедрение в практику новых методов оценки качества сперматозоидов позволит не только точно установить причину нарушения фертильности, но и дать корректный репродуктивный прогноз. Это также позволит осветить и ряд фундаментальных вопросов, таких как, например, особенности организации генетического материала в головке сперматозоида, роль отцовского генома в процессе оплодотворения и последующем эмбриональном развитии. На основании данных о нарушении целостности ДНК сперматозоидов и взаимосвязи данного показателя с параметрами спермиологического анализа или индивидуальными морфофункциональными характеристиками сперматозоидов может быть предложен ряд рекомендаций по дополнительному молекулярно-цитогенетическому методу исследования пациентов клиник ЭКО и доноров спермы. Результаты подобных исследований будут представлять несомненную практическую значимость при выборе оптимального метода преодоления бесплодия и оценке риска рождения ребенка с наследственной патологией.

Работа выполнена при финансовой поддержке гранта для студентов, аспирантов вузов правительства Санкт-Петербурга, гранта компании Carl Zeiss, гранта РФФИ (10-04-01258-а).

Литература

1. Генетика репродукции / Денисенко С.В. [и др.]. — Киев: Ферзь-ТА, 2008. — 650 с.
2. Цитогенетические методы / Кузнецова Т.В. [и др.] // Медицинские лабораторные технологии / ред. А.И. Карпищенко. — СПб: Интермедика, 1999.
3. Цитогенетический анализ сперматозоидов человека с использованием внутрицитоплазматической инъекции в ооциты мыши / Федорова И.Д. [и др.] // Генетика. — 2005. — Т. 41, № 3. — С. 396–404.
4. Agarwal A., Allamaneni S.S. The effect of sperm DNA damage on assisted reproduction outcomes // *Minerva. Gynecol.* — 2004. — Vol.56, N 3. — P.235–245.
5. Aitken R. J., De Iulius G. N. Origins and consequences of DNA damage in male germ cells // *Reprod. Biomed. Online.* — 2007. — Vol.14. — P. 727–733.
6. Apoptosis and meiotic segregation in ejaculated sperm from Robertsonian translocation carrier patients / Brugnion F. [et al.] // *Human Reproduction.* — 2010. — Vol.25, № 7. — P.1631–1642.
7. Baccetti B., Collodel G., Piomboni P. Apoptosis in human ejaculated sperm cells (notulae seminologicae) // *J. Submicrosc. Cytol. Pathol.* — 1996. — Vol.28, N 4. — P.587–596.
8. Carrell D. T., De Jonge C., Lamb D.J. The genetics of male infertility: a field of study whose time is now // *Arch. Androl.* — 2006. — Vol.52, N 4. — P. 269–274.
9. Chromatin structure in globozoospermia: a case report / Larson K. L. [et al.] // *J. Andrology.* — 2001. — Vol. 22, № 3. — P. 424–431.
10. Comparison of chromatin assays for DNA fragmentation evaluation in human sperm / Chohan K.R. [et al.] // *J. Androl.* 2006. — Vol. 27. — P. 53–59.
11. Correlations between two markers of sperm DNA integrity. DNA denaturation and DNA fragmentation in fertile and infertile men / Zini A. [et al.] // *Fertil. Steril.* — 2001. — Vol. 75. — P. 674–677.
12. Detection of DNA fragmentation and meiotic segregation in human with isolated teratozoospermia / Brahem S. [et al.] // *J. Assist. Reprod. Genet.* — 2011. — Vol. 28, N 1. — P. 41–48.
13. Detection of DNA fragmentation in human spermatozoa: correlation with semen parameters / Mehdi M. [et al.] // *Andrologia.* — 2009. — Vol. 41, N 6. — P. 383–386.
14. DNA fragmentation and meiotic segregation in sperm of carriers of a chromosomal structural abnormality / Perrin A. [et al.] // *Fertil. Steril.* — 2009. — Vol.92, № 2. — P.583–589.
15. Human Sperm DNA Fragmentation: Correlation of TUNEL Results As Assessed by Flow Cytometry and Optical Microscopy / Dominguez-Fandos D. [et al.] // *Cytometry.* — 2007. — Vol.71A. — P.1011–1018.
16. Kruger T.F., Menkveld R., Stander F.S. Sperm morphology features as a prognostic factor in vitro fertilization // *Fertil. Steril.* — 1986. — Vol. 46. — P. 1118–1123.
17. Lee J.D., Kamiguchi Y., Yanagimachi R. Analysis of chromosomal constitution of human spermatozoa with normal and aberrant head morphologies after injection into mouse oocytes // *Hum. Reprod.* — 1996. — Vol.11, N 9. — P. 1942–1946.
18. Lewis S.E., Agbaje I., Alvarez J. Sperm DNA tests as useful adjuncts to semen analysis // *Syst. Biol. Reprod. Med.* — 2008. — Vol.54, N 3. — P. 111–125.
19. Origin and biological significance of DNA fragmentation in human spermatozoa / Muratori M. [et al.] // *Front. Bioscience.* — 2006. — Vol.11. — P.1491–1499.
20. Polyploidy in large-head sperm: FISH study of three cases / Devillard F. [et al.] // *Hum. Reprod.* — 2002. — Vol.17, № 5. — P.1292–1298.
21. Sakkas D., Alvarez J.G. Sperm DNA fragmentation: mechanisms of origin, impact on reproductive outcome, and analysis // *Fertil. Steril.* — 2010. — Vol.94, № 4. — P.1027–1036.
22. 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. — Vol.127, N 2. — P.115–123.
23. Significance of Large Nuclear Vacuoles In Human Spermatozoa: Implications For Icsi / Franco J. G. Jr. [et al.] // *Reprod. Biomed. Online.* — 2008. — Vol.17, N 1. — P.42–45.
24. Simpson W.L., Rausch Jr., Rausch D.R. Imaging of Male Infertility: pictorial review // *AJR.* — 2009. — Vol.192. — P.99–109.
25. Sperm DNA Fragmentation. The role of the Urologist/Male Infertility // *SCSA Diagnostic Business Briefing*, 2005 URL: <http://www.touchbriefings.com/pdf/1322/SCSA.pdf> (дата обращения: 28.03.2012)
26. Sperm DNA integrity assessment in prediction of assisted reproduction technology outcome / Bungum M. [et al.] // *Human Reproduction.* — 2007. — Vol. 22, N 1. — P. 174–179.

27. Sperm nuclear DNA in ejaculates of fertile and infertile men: correlation with semen parameters/Khalili M. A. [et al.]/Urol. J. — 2006. — Vol.3, N 3. — P.154–159.
28. Study of aneuploidy and DNA fragmentation in gametes of patients with severe teratozoospermia / Perrin A. [et al.] // *Reprod. Biomed. Online.* — 2011. — Vol. 22, N 2. — P. 148–154.
29. Study of apoptosis and meiotic segregation in ejaculated sperm of chromosomal translocationcarrier patients / Brugnion F. [et al.] // *Hum. Reprod.* — 2006. — Vol. 21. — P.685–693.
30. Study of apoptotic DNA fragmentation in human spermatozoa / Gandini L. [et al.] // *Hum. Reprod.* — 2000. — Vol. 4. — P. 830–839.
31. Sun J. G., Jurisicova A., Casper R. F. Detection of deoxyribonucleic acid fragmentation in human sperm: correlation with fertilization in vitro // *Biology of reproduction.* — 1997. — Vol.56. — P.602–607.
32. The nonhomologous end-joining pathway of DNA repair is required for genomic stability and the suppression of translocations / Ferguson D. O. [et al.] // *PNAS.* — 2000. — Vol.97, № 12. — P.6630–6633.
33. WHO laboratory manual for the examination of human semen and sperm-cervical mucus interactions. — Geneva: Cambridge University press, 1999. — 125p.

Статья представлена В. С. Барановым,
ФГБУ «НИИАГ им. Д. О. Отта» СЗО РАМН,
Санкт-Петербург

ANALYSIS OF SPERM DNA FRAGMENTATION IN INFERTILITY PATIENTS

Shilnikova E. M., Fedorova I. D., Gzgzyan A. M.

■ **Summary:** Using Terminal Deoxynucleotidyl Transferase dUTP Nick End Labelling (TUNEL) technique the assessment of the frequency of the spermatozoa with fragmented DNA in the ejaculate from sperm donors and men with infertility was analyzed. The DNA fragmentation rate was higher in spermatozoa of carriers of a chromosomal structural abnormality compared with the control group. There was no correlation between the sperm DNA fragmentation rate and the parameters of semen analysis. The direct linear correlation between the frequency of the spermatozoa with fragmented DNA and vacuole sperm head was found. The DNA fragmentation rate was not correlated to the frequency of the spermatozoa with bulb, amorphous heads or spermatozoa with abnormal acrosome.

■ **Key words:** human spermatozoa; sperm DNA fragmentation; semen parameters; sperm heads.

■ Адреса авторов для переписки

Шильникова Евгения Михайловна — аспирант, кафедра генетики и селекции, Санкт-Петербургский Государственный Университет, Менделеевская линия д. 7/9, лаборатория пренатальной диагностики наследственных и врожденных заболеваний человека, отделение вспомогательных репродуктивных технологий. ФГБУ «НИИАГ им. Д. О. Отта» СЗО РАМН. 199034, Россия, Санкт-Петербург, Менделеевская линия, д. 3. **E-mail:** iagmail@ott.ru.

Федорова Ирина Дмитриевна — к. б. н., с. н. с., старший эмбриолог, отделение вспомогательных репродуктивных технологий. ФГБУ «НИИАГ им. Д. О. Отта» СЗО РАМН. 199034, Россия, Санкт-Петербург, Менделеевская линия, д. 3. **E-mail:** irendf@mail.ru.

Гзгзян Александр Мкртичевич — доктор наук, руководитель отделения вспомогательных репродуктивных технологий. ФГБУ «НИИАГ им. Д. О. Отта» СЗО РАМН. 199034, Россия, Санкт-Петербург, Менделеевская линия, д. 3. **E-mail:** iagmail@ott.ru.

Shilnikova Evgeniya Michailovna — PhD student, department of genetics and breeding, Saint-Petersburg State University, Mendeleevskaya line 7/9, laboratory of prenatal diagnostics of inherited and congenital human diseases, department of artificial reproductive technologies. D. O. Ott Research Institute of Obstetrics and Gynecology NWD RAMS. 199034 Russia, St.-Petersburg, Mendeleevskaya Line, 3. **E-mail:** iagmail@ott.ru.

Fedorova Irina Dmitrievna — PhD, senior Researcher, embryologist, department of artificial reproductive technologies. D. O. Ott Research Institute of Obstetrics and Gynecology NWD RAMS. 199034 Russia, St.-Petersburg, Mendeleevskaya Line, 3. **E-mail:** irendf@mail.ru.

Gzgzyan Alexander Mkrlichevich — Full Doctor, the head of the department of artificial reproductive technologies. D. O. Ott Research Institute of Obstetrics and Gynecology NWD RAMS. 199034 Russia, St.-Petersburg, Mendeleevskaya Line, 3. **E-mail:** iagmail@ott.ru.