

Фрагментация ДНК в мужских половых клетках: влияние на репродукцию, причины происхождения и методы диагностики

Макутина В.А. - бакалавр биологических наук, ГУЗ СО Институт медицинских клеточных технологий, г. Екатеринбург

Балезин С.Л. - к.м.н., ГУЗ СО Институт медицинских клеточных технологий, г. Екатеринбург

Рослий О.Ф. - д.м.н., ФГУН «Екатеринбургский медицинский центр профилактики и охраны здоровья рабочих промпредприятий» Роспотребнадзора, г.Екатеринбург

Шейко Л.Д. - к.б.н. ФГУ "Уральский научно-исследовательский институт охраны материнства и младенчества Федерального агентства по высокотехнологичной медицинской помощи", г. Екатеринбург

Fragmentation of DNA in the male germ cells: impact on reproduction, the causes of origin and methods of diagnosis

Makutina V.A., Balezin S.L., Rosliy O.F., Sheyko L.D.

Резюме

Необходимость изучения фрагментации ДНК сперматозоидов человека обусловлена возможным влиянием разрывов, унаследованных от отцовского генома, на эмбриональное развитие. В обзоре литературы рассмотрены известные механизмы, вызывающие фрагментацию ДНК в сперматозоидах человека. Данные механизмы включают в себя: дефекты ремоделинга хроматина в процессе спермиогенеза, апоптоз, повреждения ДНК свободными радикалами. Обсуждаются тесты, используемые в настоящее время для анализа фрагментации ДНК гамет.

Ключевые слова: фрагментация ДНК, апоптоз сперматозоидов, оксидативный стресс

Resume

The studying of DNA fragmentation in human sperm is necessary, because the DNA breaks, inherited from the paternal genome, could impact the embryo development. In this review the known mechanisms that cause DNA fragmentation in human sperm are considered. The mechanisms examined include: defects in chromatin remodeling during the process of spermiogenesis, apoptosis, oxygen radical-induced DNA damage. The different tests currently used for sperm DNA fragmentation analysis and the factors that determine the predictive value of sperm DNA fragmentation testing are also discussed.

Key words: DNA fragmentation, apoptosis in spermatozoa, oxidative stress

Демографические показатели России и многих стран мира свидетельствуют об увеличении частоты мужского бесплодия и субфертильности, достигающей в среднем 30-50% в общей структуре причин бесплодного брака [1]. Мета-анализ, проведенный в 90-х годах по данным зарубежных криобанков спермы, выявил снижение качества эякулята [2]. Причинами этого явления могут быть разнообразные факторы окружающей и профессиональной среды, токсические агенты, ксенобиотики, образ жизни и т.д. [3,4]. Кроме того, необходимо принять

во внимание и социально-культурные причины: поздне вступление в брак. Как следствие, наблюдается рост количества бесплодных пар и увеличение обращений в клинику искусственного оплодотворения. При этом стандартного анализа спермы, предложенного Всемирной организацией здравоохранения (ВОЗ), как правило, не достаточно для прогнозирования способности сперматозоидов к оплодотворению и формированию здорового плода. В частности, значительная часть случаев идиопатического (необъяснимого) бесплодия может быть связана с нарушениями ДНК сперматозоидов, поскольку для полноценного развития эмбриона необходима зрелость хроматина сперматозоидов и целостность отцовского генома [5-7].

Повреждения отцовского генома могут проявляться в виде генных мутаций, микроделений, анеуплоидий,

Ответственный за ведение переписки -

Макутина В.А.,

г. Екатеринбург, ул. Сыромятова 14, кв 266.

Тел.моб. 89122519002. E-mail: makutina_v@rambler.ru

фрагментаций (одно- и двух цепочечных разрывов) ДНК п, как следствие, нарушений компактизации хроматина в мужских половых клетках. Существует представление о наличии двух типов влияния отцовского генома на оплодотворение яйцеклетки и развитие эмбриона — раннего (на стадии пронуклеусов и дробления) и позднего [8]. Ранние нарушения обусловлены дисфункцией centrosом сперматозоида и дефицитом активирующих ооцит факторов. Повышенный уровень фрагментации ДНК мужских гамет может проявляться при эмбриональном развитии и на более поздних стадиях [9, 10]. Известно, что в сперме бесплодных и субфертильных мужчин содержание сперматозоидов с фрагментацией ДНК значительно выше, по сравнению с фертильными мужчинами [5, 11, 12]. Более того, обнаружена корреляция между спонтанным прерыванием беременности и увеличением процента сперматозоидов с нарушением целостности ДНК в программах вспомогательных репродуктивных технологий (ВРТ). При этом показано, что при содержании сперматозоидов с индексом фрагментации ДНК (ИФ) более 30 % вероятность вынашивания беременности до 40 недель составляет менее 1% [5, 6, 9, 10].

Благодаря наличию систем репарации, сперматозоиды способны исправлять незначительные повреждения [13]. Более того, доказана способность яйцеклетки восстанавливать поврежденную ДНК сперматозоидов [13]. Учитывая возможный риск передачи структурных дефектов генома в потомстве, наиболее существенным признается наличие двуниевых повреждений в молекуле ДНК, так как известно, что однонитевые разрывы, как правило, репарируются. Невосстановленные изменения в ДНК сперматогоний могут фиксироваться в виде мутаций после репликации. Предполагается, что увеличение частоты повреждений в мужских половых клетках способствует накоплению груза наследственной патологии у будущих поколений, а также может являться причиной появления различных форм патологии у потомства, таких как задержка физического и психического развития, новообразование, снижение фертильности [14, 15, 16].

Известно, что разрывы молекулы ДНК могут возникать в ходе сперматогенеза вследствие дефектов ремоделинга хроматина [17, 18], при нарушении процессов апоптоза в семяпродуцирующем эпителии [19, 20], из-за окислительных процессов во время миграции сперматозоидов в эпидидимус [21].

Формирование структуры хроматина мужских гамет при сперматогенезе

Изучено, что во время спермиогенеза (дифференциация гаплоидных сперматид до сперматозоидов) происходит ремоделинг хроматина, при этом нуклеосомная структура интенсивно изменяется. Хроматин сперматозоидов организован особым, отличным от других клеток образом. Большинство ядерных гистонов (более 85 %) заменяются на негистоновые ядерные белки - протамины [22, 23]. При этом происходит процесс уплотнения («компактизации») хроматина в ядрах сперматозоидов, так как протамины обладают большим средством к молеку-

ле ДНК. Конденсация хроматина происходит в несколько этапов. Пусковым механизмом служит ацетилирование N-терминальных участков гистонов и их последующие модификации, приводящие к диссоциации нуклеосом и воздействию на ДНК эндогенной нуклеазы (топоизомеразы II) [24, 25]. Топоизомеразы II образует в хромосомах сперматозоидов множественные одноцепочечные и двуцепочечные разрывы, способствуя снятию суперспирализации. В ходе ремоделинга, гистоны сначала заменяются на специфичные транзиторные белки TNP (transition nuclear protein) TP1-TP4, которые, связываясь с ДНК, способствуют взаимодействию с протамином [26]. После массового связывания TNP белков с ДНК, транскрипция прекращается, что сопровождается репарацией разрывов ДНК и связыванием ДНК с фосфорилированными протамином. Большинство млекопитающих имеют только один тип протаминов P1, но у мышей, людей и у некоторых других видов млекопитающих обнаружен второй тип протаминов P2 [27]. Оба типа протаминов синтезируются примерно в равных количествах, т.е. среднее отношение P1/P2 в сперме человека около 1,0. Изменение соотношения P1/P2 нередко связано с серьезными дефектами сперматогенеза и наблюдается в сперме некоторых бесплодных мужчин [28].

В дальнейшем, в процессе транспорта гамет по сети яичка и эпидидимусу аминокислотные остатки цистеина молекул протаминов окисляются, образуя дисульфидные связи, что способствует организации хроматина в еще более компактную структуру [29]. Доказано, что в репарации однонитевых разрывов ДНК сперматозоидов участвуют транзиторные белки. Так, TP1 может репарировать однонитевые разрывы *in vitro*, а также восстанавливать ДНК после УФ-повреждений *in vivo* [30]. Разрывы ДНК сперматозоидов могут являться следствием нарушения процессов репарации в ходе ремоделинга хроматина. Вместе с тем, не исключено, что подобные дефекты генетического материала в формирующихся сперматозоидах инициируют процессы апоптоза [31].

Апоптоз

Известно, что другой возможной причиной возникновения фрагментаций ДНК может быть инициация апоптоза в ходе сперматогенеза или движения клеток по мужскому или женскому половому тракту. Апоптоз (запрограммированная гибель клеток) является физиологическим механизмом контролируемого элиминирования клеток необходимого для поддержания гомеостаза организма. В мужской репродуктивной системе апоптоз служит для уменьшения числа потенциально возможных гамет и устранения патологических сперматозоидов [29, 32, 33]. Предполагается, что из всех формирующихся сперматозоидов более 75% элиминируются путем апоптоза [34].

Апоптоз может быть инициирован экспрессией белка Fas (фактор некроза опухоли), активностью каспаз, экстернализацией фосфатидил серина, активными метаболитами кислорода, фрагментациями ДНК [35-37]. Однако обнаружено, что в эякуляте мужчины присутствуют

сперматозонды, в которых механизм апоптоза был запущен, но не завершен (неполный апоптоз или abortивный апоптоз) [38, 39]. В результате abortивного апоптоза не все патологические клетки с нарушениями целостности ДНК элиминируются. Данное явление может происходить по нескольким причинам. Во-первых, количество продуцируемых сперматозондов может быть не достаточно для инициации апоптоза (например, у мужчин с гипосперматогенезом) [39]. В этом случае, наличие фактора Fas может не приводить к элиминации гамет. Во-вторых, проблема может быть непосредственно в самом процессе активации Fas-медиатора. Показано, что у мужчин с аномальными параметрами спермы, Fas-положительными могут быть до 50 % сперматозондов [38].

Поскольку апоптоз является системой устранения дефектных клеток, было выдвинуто предположение о существовании взаимосвязи между фрагментацией ДНК в сперматозоидах и апоптозом. Однако до настоящего времени не обнаружено четкой корреляции между количеством сперматозондов с поврежденной ДНК и наличием таких маркеров апоптоза, как Fas-рецепторы, p53 и капациитазы [20, 40, 41].

Окислительный стресс

Окислительный стресс является результатом дисбаланса между содержанием активных форм кислорода (АФК) и наличием антиоксидантов в организме. Физиологическое количество АФК необходимо для поддержания нормального функционирования половых клеток, развития акросомной реакции, гиперактивации и капациитации сперматозондов [42- 44]. Показано, что продукция свободных радикалов в сперме возрастает при увеличении содержания нейтрофильных лейкоцитов [39, 49]. Другим источником АФК являются незрелые сперматозонды с остаточной цитоплазмой (цитоплазматическими каплями), образующиеся при нарушении процессов сперматогенеза [21, 51]. Избыток АФК оказывает пагубное воздействие на клеточные мембраны сперматозондов, вызывая повреждения ядерной и митохондриальной ДНК [45, 46] и инициируя апоптоз [47, 48].

В норме генетический материал мужских гамет защищен от окислительного стресса плотной упаковкой ДНК и наличием антиоксидантной системы семенной плазмы [52]. Вместе с тем, известно, что сперматозонды более чувствительны к действию АФК (по сравнению с другими клетками организма) в связи с высоким содержанием полиненасыщенных жирных кислот в плазматических мембранах и низкой концентрацией антиоксидантных ферментов в цитоплазме.

Известно, что мембранные полиненасыщенные жирные кислоты содержат неконъюгированные двойные связи. Наличие двойной связи в непосредственной близости от метиленовой группы делает связь метилированный углерод - водород более восприимчивой к взаимодействию со свободными радикалами [39, 53]. Повышенное содержание АФК приводит к разрушению мембран и, как следствие, к снижению подвижности сперматозондов и уменьшению их оплодотворяющей способно-

сти [54]. Кроме того, в случаях нарушений упаковки хроматина (например, при протаминной недостаточности), свободные радикалы могут непосредственно воздействовать на пуриновые и пиримидиновые основания и дезоксирибозный остов хромосом [55]. Повреждения в геноме сперматозондов под действием высоких концентраций АФК могут проявляться в виде денатурации ДНК, модификации оснований, точечных мутаций, полиморфизма генов, делеций, сдвига рамки считывания, а также в виде одно- и двуцепочечных разрывов нитей ДНК [42, 48]. Если нарушения генома значительны, неизбежно происходит инициация процессов апоптоза. Также показано, что АФК непосредственно стимулирует выработку цитохрома С и каспаз, что в свою очередь активирует процессы апоптоза [47].

Методы исследования ДНК фрагментаций

В настоящее время предложено несколько методов диагностики повреждений ДНК сперматозондов. К основным методам относятся: TUNEL-тест; электрофорез ДНК индивидуальных, заключенных в агарозу клеток; *in situ* ник трансляция; а также тесты на структуру (SCSA) и дисперсию хроматина (SCD) [31, 37].

TUNEL (Deoxynucleotidyl Transferases dUTP Nick End Labeling) – метод прямого мечення концевой группы 3'-ОН ДНК нуклеотидом (dUTP), несущим флуорохром, с помощью терминальной дезоксирибонуклеотидазы трансферазы (TdT) [37, 56]. Использование этого метода позволяет детектировать как одноцепочечные, так и двуцепочечные разрывы ДНК. Процент сперматозондов с фрагментированной ДНК определяется путем прямого наблюдения на эпифлуоресцентном микроскопе либо с помощью проточной цитометрии.

Метод ник-трансляции (*in situ* nick-translation) основан на включении радиоактивного тимидина в 3' – ОН концы фрагментов ДНК с помощью ДНК-полимеразы. Существуют модификации этого метода с использованием меченных биотином или дигоксигенином нуклеотидов [57, 58].

Comet анализ (Single-Cell Gel Electrophoresis) – электрофорез единичных клеток. Метод позволяет определить содержание высоко- и низкомолекулярных ДНК по ареалу низкомолекулярной ДНК, напоминающего хвост кометы [59, 60]. Результат оценивают по числу клеток с «кометным хвостом». Для автоматизированной оценки результата разработано специальное программное обеспечение.

Такие методы как **окраска акридиновым оранжевым (АО) и SCSA** (Sperm Chromatin Structure Assay) основаны на чувствительности поврежденной ДНК к индуцированной денатурации кислотами и на метакроматических свойствах интеркалирующего красителя акридинового оранжевого. При этом, чем больше содержится в ДНК разрывов, тем более эффективной будет процедура денатурации и тем большая доля ДНК перейдет из двунитовой формы в однонитовую. В дальнейшем денатурированные ДНК окрашиваются акридиновым оранжевым, который связываясь с двуцепочечной ДНК про-

являет зеленую флуоресценцию, а при связывании с однопочечной – красную [59, 61]. Результат можно оценить микроскопически (АО) либо с использованием проточной цитометрии (SCSA). Степень повреждения ДНК — индекс фрагментации (ИФ) — оценивается по отношению числа клеток с красной флуоресценцией к общему числу флуоресцирующих клеток. По значению предложены следующие категории качества эякулята: отличный — ИФ менее 15%, хороший — 15—24%, удовлетворительный — 25—30%, плохой — более 30%. Показано, что в норме содержание сперматозоидов с красной флуоресценцией не превышает 30% [61-63]. Метод АО редко используется в исследовательской и лабораторной практике в связи с такими недостатками как быстрое затухание флуоресценции, гетерогенное окрашивание слайдов, низкая воспроизводимость результатов [37]. Применение техники проточной цитофлюориметрии (SCSA) дает несомненные преимущества по сравнению с использованием световой микроскопии, прежде всего заключающиеся в возможности объективно и быстро оценить большое количество клеток, что приводит к высокой статистической достоверности результатов. Эта методика позволяет также идентифицировать ядра незрелых клеток по высокой интенсивности зеленой флуоресценции. Таким образом, метод SCSA регистрирует не только разрывы ДНК, но и степень плотности упаковки хроматина [8].

Тест на дисперсию хроматина (Sperm Chromatin Dispersion test - SCD) основан на восприимчивости ДНК сперматозоидов к кислотной денатурации ДНК. Метод заключается в иммобилизации гамет в агарозной подложке, удалении мембран и белков лизирующим раствором и кислотной денатурации ДНК, что приводит к диффузии петель ДНК и образованию центральной части (кора) и периферических петель ДНК (так называемый "гало эффект") [5, 64]. При этом ядра сперматозоидов, содержащих фрагментированную ДНК, не образуют (либо образуют незначительные) петли ДНК, тогда как сперматозоиды с низким уровнем повреждения ДНК формируют выраженный "гало эффект". Препараты в дальнейшем окрашиваются флуорохромом и анализируются вручную или с использованием морфометрической системы анализа изображений. Особенностью SCD-теста является возможность разделения клеток на категории по степени фрагментации ДНК. Показано, что в норме при проведении теста SCD содержание сперматозоидов с поврежденной ДНК не превышает 20 % [11]. Разработана модификация метода SCD для применения в клинической практике - Halosperm kit [11]. При использовании этого теста хроматин сперматозоидов сохраняет большую плотность, что позволяет проводить оценку результатов при микроскопировании в светлом поле. Еще одним преимуществом теста является видимость интактного хвоста у сперматозоидов, что облегчает дифференциацию мужских гамет от других типов клеток находящихся в эякуляте.

При сопоставлении методов оценки фрагмента-

ции ДНК сперматозоидов показано, что в целом данные, полученные различными путями, коррелируют друг с другом [31, 37]. Тем не менее, по мнению многих исследователей, оценка фрагментации ДНК методом SCSA более объективна и точна [65]. Однако для внедрения SCSA, а также других методов, в клиническую практику требуется дорогостоящее оборудование и обученный персонал. Другой значительной проблемой является отсутствие стандартов пороговых значений нормы, например, в методах Comet, инк трансляции [65]. Вследствие этого многие из вышеперечисленных процедур используются только в исследовательских целях.

Для внедрения анализа фрагментации ДНК в качестве рутинного теста в практику андрологической лаборатории предпочтительна простая, воспроизводимая методика анализа, не требующая приобретения дорогостоящего оборудования и реактивов. Модификация SCD - Halosperm kit - позволяет оценить состояние ДНК сперматозоидов при микроскопировании в светлом поле с применением автоматизированных систем анализа изображений. При этом установлена высокая корреляция результатов теста с другими вышеперечисленными методами диагностики [11]. Наиболее перспективна данная методика при проведении популяционных скрининговых исследований, оценке экологических и производственных факторов в области мужской репродуктивной токсикологии, а также в экспериментах и модельных опытах на животных (разнообразие набора реагентов для грызунов).

Заключение

Обзор исследований фрагментации ДНК в мужских половых клетках свидетельствует о безусловном диагностическом и прогностическом значении данного критерия как в клинической практике при диагностике и лечении бесплодия в супружеской паре, так и в профилактической медицине в области репродуктивной токсикологии и изучения отдаленных последствий для потомства. На повестку дня в репродуктивной медицине встает внедрение указанных методов в клиническую практику с формированием международных стандартов и критериев оценки качества процедур. Подтверждением этого явилась первая специализированная конференция под эгидой европейской и американской ассоциаций репродуктивной медицины "ДНК спермы: структура, защита и уязвимость. От фундаментальной науки до клинической практики" (Стокгольм, 2009 г.), собравшей вместе ведущих специалистов в данной области.

Приоритетными направлениями научных исследований в этой области названы разработка новых методов оценки повреждений генома сперматозоидов, исследования в области эпигенетических последствий, выявление взаимосвязи между уровнями повреждения ДНК сперматозоидов и концентраций активных метаболитов кислорода и азота в эякуляте, процессами апоптоза, полиморфизмами генов детоксикации и т.д. ■

Литература:

1. Maduro MR, Lamb DJ. Understanding new genetics of male infertility. *J Urol* 2002;168: 2197-205.
2. Carlsen E, Giwercman A., Keiding N., Skakkebaek N.E. Evidence for decreasing quality of semen during past 50 years. *Br Med J* 305: 609-613.
3. Sharpe R.M. Declining sperm counts in men – is there an endocrine cause? *J Endocrinol* 136: 357-360.
4. Kumar S, Kumari A, Murarka S. Lifestyle factors in deteriorating male reproductive health. *Indian J Exp Biol* 2009;47(8): 615-24.
5. Evenson D.P., Jost L.K., Marshall D., Zinaman M.J., Clegg E., Purvis K., de Angelis P., Claussen O.P. Utility of the sperm chromatin structure assay as a diagnostic and prognostic tool in the human fertility clinic. *Hum Reprod* 1999; 14: 1039-1049.
6. Larson-Cook K.L., Brannian J.D., Hansen K.A., Kasperson K.M., Aamold E.T., Evenson D.P. Relationship between the outcomes of assisted reproductive techniques and sperm DNA fragmentation as measured by the sperm chromatin structure assay. *Fertil Steril* 2003; 80: 895-902.
7. Sakkas D., Urner F., Bizzaro D., Manicardi G., Bianchi P.G., Shoukir Y., et al. Sperm nuclear DNA damage and altered chromatin structure: effect on fertilization and embryo development. *Hum Reprod* 1998; 13 (Suppl 4): 11-19.
8. Воробьева О.А., Филатов М.В., Леонтьева О.А. Значение анализа организации хроматина ядер сперматозоидов в диагностике мужского бесплодия. *Проблемы репродукции* 1997; 4: 23-27.
9. Carrell D.T., Liu L., Peterson C.M. Sperm DNA fragmentation is increased in couples with unexplained recurrent pregnancy loss. *Arch Androl* 2003; 49: 49-55.
10. Lin M.N., Kuo-Kuang Lee R., Li Su, sun F.J., Hwu Y.M. Sperm chromatin structure assay parameters are not related to fertilization rates, embryo quality, and pregnancy rates in in vitro fertilization and intracytoplasmic sperm injection, but might be related to spontaneous abortion rates. *J Fertil Steril* 2008; 90(2): 352-359.
11. Fernandez J.L., Muriel L., Rivero M.T., Goyanes V., Vazquez R., Alvarez J.G. The Sperm Chromatin Dispersion Test: A Simple Method for the Determination of Sperm DNA Fragmentation. *J of Andrology* 2003; 1: 59-66.
12. Enciso M., Muriel L., Fernandez J.L., et al. Infertile men with varicocele show a high relative proportion of sperm cells with intense nuclear damage level, evidenced by the sperm chromatin dispersion test. *J of Androl*, 2006; 27: 106-111.
12. Shaman J.A., Ward W.S. Sperm chromatin stability and susceptibility to damage in relation to its structure. In: De Jonge C., Barratt C. The sperm cell. Cambridge University Press; 2006. p 31-49.
13. Agarwal A., Prabhakaran S.A., Sikka S.C. Clinical relevance of oxidative stress in patients with male factor infertility: evidence-based analysis. *AUA Update* 2007; 26: 1-12.
14. Aitken R.J., Krausz C. Oxidative stress, DNA damage and the Y chromosome. *Reproduction* 2001; 122: 497-506.
15. Aitken R.J., Baker M.A., Sawyer D. Oxidative stress in the male germ line and its role in the aetiology of male infertility and genetic disease. *Reprod Biomed Online* 2003; 7: 65-70.
16. Lewis S.E., Agbaje I., Alvarez J. Sperm DNA tests as useful adjuncts to semen analysis. *Syst Biol Reprod Med* 2008; 54(3): 111-125.
17. Gorczyca W., Traganos F., Jesionowska H., Darzynkiewicz Z. Presence of DNA strand breaks and increased sensitivity of DNA in situ denaturation in abnormal human sperm cells: analogy to apoptosis of somatic cells. *Exp Cell Res* 1993; 207: 202-205.
18. 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: 864-867.
19. Sakkas D., Mariethoz E., Manicardi G., Bizzaro D., Bianchi P.G., Bianchi U. Origin of DNA damage in ejaculated human spermatozoa. *Rev Reprod* 1999; 4: 31-37.
20. Sakkas D., Moffatt O., Manicardi G.C., Mariethoz E., Tarozzi N., Bizzaro D. Nature of DNA damage in ejaculated human spermatozoa and the possible involvement of apoptosis. *Biol Reprod* 2002; 66: 1061-1067.
21. Aitken R.J., De Iulius G.N. Origins and consequences of DNA damage in male germ cells. *Reprod Biomed Online* 2007; 14: 727-733.
22. 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: 255-263.
23. Fuentes-Mascorro G., Serrano H., Rosado A. Sperm chromatin. *Arch Androl* 2000; 45: 215-225.
24. Govin J., Caron C., Lestrat C. et al. The role of histones in chromatin remodeling during mammalian spermiogenesis. *Eur J Biochem* 2004; 271: 3459-3469.
25. 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: 910-918.
26. Oko R.J., Jando V., Wagner C.L., Kistler W.S., Hermo L.S. Chromatin reorganization in rat spermatids during the disappearance of testis-specific histone, H1t, and the appearance of transition proteins TP1 and TP2. *Biol Reprod* 1996; 54: 1141-1157.
27. Wykes S.M., Krawets S.A. The structural organization of sperm chromatin. *J Biol Chem* 2003; 278: 29471-29477.
28. Carrell D.T., Emery B.R., Hammoud S. Altered protamine expression and diminished spermatogenesis: what is the link? *Hum Reprod Update* 2007;
29. Seli E., Sakkas D. Spermatozoal nuclear determinants of reproductive outcome: implications for ART. *Hum Reprod Update* 2005; 11: 337-349.
30. Caron N., Veilleux S., Boissonneault G. Stimulation of DNA repair by the spermatid TP1 protein. *Mol Reprod Dev* 2001; 58: 437-443.
31. Маркова Е.В., Замай А.С. Фрагментация ДНК в сперматозоидах человека (обзор литературы). *Проблемы репродукции* 2006; 4
32. Kerr J.F., Wyllie A.H., Currie A.R. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br J Cancer* 1972; 26: 239-257.
33. Baum J.S., St George J.P., McCall K. Programmed cell death in the germline. *Semin Cell Dev Biol* 2005; 16: 245-259.
34. Huckins C. The morphology and kinetics of spermatogonial degeneration in normal adult rats: an analysis using a simplified classification of the germinal epithelium. *Anat Rec* 1978; 190: 905-926
35. Suda T., Takahashi T., Golstein P., Nagata S. Molecular cloning and expression of the Fas ligand, a novel member of the tumor necrosis factor family. *Cell* 1993; 75: 1169-1178.
36. Kane D.J., Sarafian T.A., Anton R., Hahn H., Gralla E.B., Valentine J.S., et al. Bcl-2 inhibition of neural death: decreased generation of reactive oxygen species. *Science* 1993; 262: 1274-1277.
37. Angelopoulou R., Plastira K., Msaouel P. Spermatozoal sensitive biomarkers to defective protaminosis and

- fragmented DNA. *Reprod Biol Endocrinol* 2007; 30: 5-36.
38. Sakkas D, Mariethoz E, St John J.C. Abnormal sperm parameters in humans are indicative of an abortive apoptotic mechanism linked to the Fas-mediated pathway. *Exp Cell Res* 1999; 251: 350-355.
39. Mekker K, Agarwal a., Sharma R. Oxidative stress & male infertility. *Indian J Med Res* 2009; 129: 357-367.
40. Morris I.D. Sperm DNA damage and cancer treatment. *Int J Androl* 2002; 25: 255-261.
41. Manicardi GC, Tombacco A, Bizzaro D, Bianchi U, Bianchi PG, Sakkas D. DNA strand breaks in ejaculated human spermatozoa: comparison of susceptibility to the nick translation and terminal transferase assays. *Histochem J* 1998; 30:33-39.
42. Kodama H, Yamaguchi R, Fukuda J, Kasai H, Tanaka T. Increased oxidative deoxyribonucleic acid damage in the spermatozoa of infertile male patients. *Fertil Steril* 1997; 68: 519-524.
43. Aitken R.J. The human spermatozoon – a cell in crisis? *J Reprod Fertil* 1999; 3: 169-173.
44. Griveau J.F., Le Lannou D. Reactive oxygen species and human spermatozoa: physiology and pathology. *Int J Androl* 1997; 20: 61-69.
45. Paasch U, Sharma R.K., Gupta A.K., et al. Cryopreservation and thawing is associated with varying extent of activation of apoptotic machinery in subsets of ejaculated human spermatozoa. *Biol Reprod* 2004; 71: 1828-1837.
46. Cande C, Ceconi F., Dessen P., Kroemer G. Apoptosis-inducing factor (AIF): key to the conserved caspase-independent pathways of cell death? *J Cell sci* 2002; 115: 4727-4734.
47. Wang X, Sharma R.K., Sikka S.C., Thomas A.J. Jr., Falcone T, Agarwal A. Oxidative stress is associated with increased apoptosis leading to spermatozoa DNA damage in patients with male factor infertility. *Fertil Steril* 2003; 80: 531-535.
48. Kemal D.N., Morshedi M., Oehninger S. Effects of hydrogen peroxide on DNA and plasma membrane integrity of human spermatozoa. *Ferth Steril* 2000; 74: 1200-1207.
49. Pasqualotto F.F., Sharma R.K., Potts J.M., Nelson D.R., Thomas A.J., Agarwal A. Seminal oxidative stress in patients with chronic prostatitis. *Urology* 2000; 55: 881-885.
50. Tremellen K. Oxidative stress and male infertility – a clinical perspective. *Hum Reprod Update* 2008; 14(3): 243-258.
51. Gomez E, Buckingham D.W., Brindle J., Lanzafame F., Irvine D.S., Aitken R.J. Development of an image analysis system to monitor the retention of residual cytoplasm by human spermatozoa: correlation with biochemical markers of the cytoplasmic space, oxidative stress, and sperm function. *J Androl* 1996; 17: 276-287.
52. Twigg J., Irwine D.S., Houtson P., Fulton N., Michael L., Aitken R.J. Iatrogenic DNA damage induced in human spermatozoa during sperm preparation: productive significance of seminal plasma. *Mol Hum Reprod* 1998; 4: 439-445.
53. Aitken R.J. Free radicals, lipid peroxidation and sperm function. *Reprod Fertil dev* 1995; 7: 659-668.
54. Agarwal A., Ikemoto I, Loughlin K.R. relationship of sperm parameters with levels of reactive species in semen specimens. *J Urol* 1994; 152: 107-110.
55. Oliva R. Protamines and male infertility. *Hum Reprod Update* 2006; 12: 417-435.
56. Gavrieli Y., Sherman Y., Ben-Sasson S.A. Identification of programmed cell death in situ via specific labeling of nuclear DNA fragmentation. *J Cell Biol* 1992; 119: 493-501.
57. Bianchi P.G., Manicardi G.C., Bizzaro D., Bianchi D., Sakkas D. Effect of deoxyribonucleic acid protamination on fluorochrome staining and in situ nick-translation of murine and human mature spermatozoa. *Bio Reprod* 1993; 49: 1083-1088.
58. Muriel L., Segrelles E., Goyanes V., Gosalves J., Fernandez J.I. Structure of human sperm DNA and background damage, analysed by in situ enzymatic treatment and digital image analysis. *Molecular Hum Reprod* 2004; 10(3): 1-7.
59. Evenson D.P., Larson K.L., Jost L.K. Sperm chromatin structure assay: its clinical use for detecting sperm DNA fragmentation in male infertility and comparisons with other techniques. *J Androl* 2002; 23: 25-43.
60. Morris I.D., Ilott S., Dixon L., Brison D.R. The spectrum of DNA damage in human sperm assessed by single cell gel electrophoresis (comet assay) and its relationship to fertilization and embryo development. *Hum Reprod* 2002; 17: 990-998.
61. Schlegel P.N., Paduch D.A. Yet another test of sperm chromatin structure. *Fertil Steril* 2005; 84: 854-859.
62. Shibahara H., Onagawa T., Ayustawati, et al. Clinical significance of the Acridine Orange test performed as a routine examination: comparison with the CASA estimates and strict criteria. *Int J Androl* 2003; 26: 236-241.
63. Virant-Klun I., Tomazevic T., Meden-Vrtovec H. Sperm single-stranded DNA, detected by acridine orange staining, reduces fertilization and quality of ICSI-derived embryos. *J Assist Reprod Genet* 2002; 19: 319-328.
64. Chohan K.R., Griffin J., Lafromboise M., de Jonge C., Carrel D.T. Comparison of chromatin assays for DNA fragmentation evaluation in human sperm. *J Androl* 2006; 27 (1): 53-59.
65. Evenson D.P., Kasperson K., Wixon R.L. Analysis of sperm DNA fragmentation using flow cytometry and other techniques. *J Soc Reprod Fertil Suppl* 2007; 65: 93-113.