

М. А. Шубина, Е. А. Корочкина

Фрагментация ДНК в сперматозоидах млекопитающих и методы ее исследования (обзор)

Аннотация.

Цель: систематизирование и анализ научной информации о фрагментации ДНК сперматозоидов сельскохозяйственных животных и методах ее исследования.

Не так давно был обнаружен один из факторов, негативно влияющих на фертильность самцов-производителей - фрагментация ДНК сперматозоидов. Многочисленными исследованиями установлено, что фрагментация ДНК — это разрыв нитей ДНК на части. По мнению Agarwal A. (2003), фрагментация ДНК сперматозоидов является наиболее частым нарушением ультраструктуры сперматозоидов. По данным Baumber J. с соавт. (2003) определение фрагментации ДНК сперматозоидов в настоящее время является одним из современных методов оценки качества спермы. Многочисленными исследованиями сформирован пул данных о факторах, вызывающих фрагментацию ДНК в сперматозоидах. Так, Baumber J. с соавт. (2003) в своих исследованиях указывает на то, что причиной фрагментации ДНК могут быть проблемы с ремоделированием хроматина, апоптозом и окислительными процессами в сперме. Исследованиями, проведенными Абонеевым В. В. с соавтор. (2021) установлено, что при тяжелых формах патозооспермии количество сперматозоидов с фрагментированной ДНК выше, чем при менее выраженных нарушениях сперматогенеза [24]. Появление аномальных и малоподвижных сперматозоидов в эякуляте является одним из косвенных маркеров повышения индекса фрагментации ДНК в сперматозоидах, что негативно отражается на оплодотворяющей способности спермы. В связи с этим исследование фрагментации ДНК сперматозоидов является эффективным диагностическим методом определения фертильности. Учитывая некоторые патофизиологические аспекты, приводящие к фрагментации ДНК, определение индекса данного процесса априори не может быть рутинным. В настоящее время активно используются такие высокоточные методы как TUNEL (terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP nick end labeling) – маркировка концов разорванной молекулы, SCSA (Sperm Chromatin Structure Assay) – исследование дисперсии хроматина сперматозоидов, Comet (Single-cell gel electrophoresis assay, Cometassay) – способен выявить разрывы в одиночных клетках, SCD (Sperm Chromatin Dispersion test) – тест на дисперсию хроматина и др.

Ключевые слова: фрагментация ДНК; сперматозоиды; млекопитающие; методы исследования.

Авторы:

Шубина М. А. — студент; e-mail: maris.shubi@yandex.ru;

Корочкина Е. А. — доктор ветеринарных наук; e-mail: e.kora@mail.ru.

ФГБОУ ВО «Санкт-Петербургский государственный университет ветеринарной медицины»; 196084, Россия, Санкт-Петербург, Черниговская ул., 5.

Введение. Фрагментация ДНК представляет собой разрыв нитей ДНК на части. По данным Agarwal A. (2003), фрагментация ДНК сперматозоидов является наиболее частым нарушением ультраструктуры сперматозоидов, которое представляет собой разрывы в одной или сразу в двух цепях ДНК [1]. Kumar K. с соавтор. (2012) отмечают, что сами разрывы происходят в результате снижения уровня содержания протаминов, белков, которые выступают в роли защитного механизма от внешнего воздействия [2].

Фрагментация по происхождению бывает целенаправленной, созданной в условиях лаборатории и естественной, апоптической, способной накапливаться в клетке и, как следствие, вызы-

вать запрограммированную гибель клетки [3]. По мнению Baumber J. с соавтор. (2003), причинами появления разрывов ДНК нитей могут служить различные факторы, такие как возраст, воздействие стресса, неблагоприятные условия содержания, окислительный стресс, который приводит к повреждению клетки из-за избыточного количества свободных радикалов, онкологические заболевания, хронические или инфекционные заболевания, облучение, а также могут быть результатом дефектов в процессе созревания (репарации и ремоделирование хроматина) [4, 5]. Кроме этого по данным Гнездиловой Л. А. с соавтор. (2021) существует взаимосвязь уровня фрагментации ДНК и способа хранения

спермы [6]. Так, в свежеполученном эякуляте барана уровень фрагментации (DFI) составлял 7 %, а в криоконсервированном - более 30 % (при норме равной 30 % [7]).

В настоящее время вопрос патофизиологических механизмов, которые приводят к фрагментации ДНК, является малоизученным [8, 9]. Lopez-Fernandez с соавтор. (2007) отмечают, что дефекты ремоделирования хроматина, апоптоз и окислительные процессы могут быть причинами фрагментации ДНК [3, 5, 9–16]. Проводя анализ литературных данных о дефектах ремоделирования хроматина, нужно отметить, что ДНК в сперматозоидах сильно сжата с помощью специальных негистоновых белков — протаминов [12, 13], что делает их ядра значительно меньше по размеру, чем ядра соматических клеток, примерно в 6 раз [12]. Такое устройство ДНК, по мнению Kadioglu A. с соавтор. (2017), плотнее, чем в метафазных хромосомах [8]. В процессе реконструкции хроматина с участием топоизомераз, ферментов, которые катализируют и обеспечивают раскручивание ДНК, возникают разрывы в ее одно- и двухцепочечной структуре. Эти разрывы являются особенно характерными для постмейотического созревания в сперматогенезе, однако они имеют краткосрочный характер и присутствуют только в зрелых сперматозоидах.

Hamilton T. с соавтор. (2016) установили, что начальная фаза конденсации хроматина характеризуется увеличением числа разрывов в ДНК, после чего они подвергаются репарации, а их присоединение осуществляется транзиторными белками [5, 12, 13]. Во время переноса сперматозоидов через эпидидимис цистеиновые группы протаминов подвергаются окислению, что приводит к образованию дисульфидных связей. Эти связи укрепляют и уплотняют хроматин, что играет важную роль в формировании головки сперматозоида, подавлении транскрипции мужского генома, защите и стабилизации ДНК сперматозоида. Результаты исследований, проведенных Schulte R. T. с соавтор. (2010), указывают на то, что мутации, возникающие в процессе ремоделирования хроматина, считаются одним из основных источников разрывов ДНК в сперматозоидах [17]. Их наличие указывает на неполное завершение процесса созревания гамет.

Многочисленными исследованиями установлено, что апоптоз является генетически запрограммированной формой гибели клетки [16]. Повреждение ДНК путем апоптоза происходит в основном в семенниках во время сперматогенеза. Необходимость данного механизма заключается

в устранении дефектных сперматозоидов. Различают также неполный или abortивный апоптоз, при котором данный процесс не завершается полностью. Исследования апоптоза производятся путем обнаружения маркеров - инициаторов Fas, Bcl-X, p53 и аннексина V. Рена F. J. с соавтор. (2019) в своей работе сообщает, что апоптоз имеет частичную роль в процессе фрагментации ДНК [18]. Причиной неполного апоптоза могут быть различные факторы, такие как гипосперматогенез или нарушения в активации маркеров. По данным Cande C. с соавтор. (2019), апоптоз может достигать до 75 %, в то время как при сбое активации маркеров данный параметр достигнет лишь 50 %, при этом в эякуляте будет зарегистрировано наличие дефектных сперматозоидов [10]. Патологические сперматозоиды, оставшиеся в сперме, снижают шансы успешности естественного оплодотворения яйцеклетки. На данный момент четкой корреляции апоптоза и фрагментации ДНК не обнаружено [1–23].

Окислительные процессы, проходящие в сперматозоидах, являются следствием продукции активных форм кислорода (АФК). Воздействие активных форм кислорода сводится к их способности разрушать фосфолипидные мембраны сперматозоидов [9]. Так как антиоксидантов, веществ способных ингибировать окислительные процессы, в сперматозоидах ограниченное количество, то и процесс восстановления не может произойти, что служит причиной окислительного стресса. Но мишенью АФК, по мнению Kuchakulla M. с соавтор. (2020), является не мембрана сперматозоида, а непосредственно генетический материал — ДНК [19]. В следствие этого происходит дестабилизация оснований и разрывы в цепях ДНК, что в свою очередь приводит к инициации апоптоза и снижению оплодотворяющей способности [11].

Принимая во внимание протоколы оценки качественных показателей спермы нужно отметить, что определение целостности ДНК в сперматозоидах не является рутинным методом спермиологического исследования [1–23]. На сегодняшний день для определения индекса фрагментации ДНК сперматозоидов используют такие высокоточные методы как TUNEL, Comet и др. Но высокая стоимость анализа ограничивает частоту его проведения и внедрения в лабораторную андрологическую практику как рутинного. В связи с этим учёными Thippeswamy V. B. с соавтор. (2014) было проведено изучение взаимосвязи основных морфофункциональных параметров спермы: подвижности, концентрации и морфоло-

гии с уровнем фрагментации ДНК. Изучение параметров производилось при помощи метода TUNEL (Terminal deoxynucleotidyltransferase UTP nickendlabeling). Сравнительный анализ показателей спермы быка — производителя с фрагментацией ДНК выше 15 % и ниже 15 % не показал достоверных отличий [24]. Вместе с тем были зарегистрированы статистически значимые изменения в параметрах подвижности сперматозоидов. Так, была установлена высокая подвижность у сперматозоидов с фрагментацией ДНК ниже 15 % по сравнению с противоположной группой. Hirsh A. с соавтор. (2003) в своих исследованиях выявили появление аномальных и малоподвижных сперматозоидов в эякуляте, что повышает вероятность фрагментированной в них ДНК и, в конечном итоге, приводит к снижению фертильности [8, 14, 15].

Исходя из выше приведенных данных и результатов исследований, можно сделать вывод о том, что высокий уровень фрагментации ДНК является фактором, безусловно влияющим на плодovitость самцов. Также публикуются исследования, проведенные Kumar K. с соавтор. (2012), о взаимосвязи поврежденной ДНК и невынашивании плода. При наличии более, чем двух аборт, рекомендуется проверка уровня фрагментации ДНК сперматозоидов. Кроме этого существует прямая связь между нарушением сперматогенеза и увеличением уровня фрагментации ДНК в мужских гаметех. По мнению Gonzalez-Marin C. с соавтор. (2012), сами изменения могут происходить на любой стадии, начиная с зародышевой клетки [5]. Чем тяжелее олигозооспермия, тем выше вероятность превышения нормы частоты фрагментации ДНК в сперматозоидах. Аналогичные результаты были получены Tesarik J. и соавт. (2004) для показателей подвижности и морфологии сперматозоидов [22]. Одновременно необходимо отметить, что среди самцов с нарушениями репродуктивной функции, имеющими различные формы патозооспермии, есть случаи, при которых отсутствует повышенный уровень фрагментации ДНК в гаметех [20].

Стоит учитывать, что стандартное исследование спермы не может дать полную информацию о состоянии генома сперматозоида, так как обнаружена повышенная частота фрагментированной ДНК в сперматозоидах, которые в целом соответствуют норме по отдельным показателям спермограммы (количество, подвижность, форма). Так, Fortes M. R. S. и соавт. (2014) выявили, что содержащийся протамин в сперме и фрагментация ДНК тесно связаны между собой [11]. В противоположность этому Castro L. S. и

соавт. (2018) утверждают, что нехватка протамина в сперматозоидах не влияет на фертильность у быков — производителей [3].

Учитывая установленную взаимосвязь фрагментации ДНК и оплодотворяющей способности сперматозоидов, а также эмбриональной смертности актуальным является оценка фрагментации ДНК. На сегодняшний день существует несколько достоверных способов определения индекса фрагментации ДНК. Так, исследователями Peris-Frau P. с соавтор. (2019) использовался метод TUNEL для сперматозоидов барана [20], Гнездиловой Л. А. с соавтор. (2019) — метод SCSA для определения индекса фрагментации ДНК в сперматозоидах баранов — производителей [6], Ram C. с соавтор. (2008) — метод SCD для сперматозоидов кобелей [21], Goran Gajski с соавтор. (2021) — метод гель-электрофорез или Comet метод для сперматозоидов различных видов животных [12].

TUNEL относится к прямым методам, а его сущность заключается в мечении одно- или двухцепочечных разрывов ДНК, а именно их концов, специфичным флуорохромным красителем — флуоресцеином. Далее на люминесцентном микроскопе просматривается уровень dUTP, который пропорционален количеству разрывов или TUNEL позитивных клеток. Таким образом, интенсивность окрашивания участков ДНК сопоставляется с количеством разрывов. Расчет ведется в процентном соотношении. Kuchakulla M. с соавт. (2020) выявили, что преимуществом данного анализа является высокая чувствительность и специфичность, обнаружение разрывов как одно-, так и двуцепочечных [19]. Из минусов данного метода принято считать трудоёмкость, дорогостоящее оборудование и материалы [7].

Comet (Single-cell gel electrophoresis assay, Comet assay) — как и предыдущий метод относится к прямым. Сущность данного метода заключается в электрофорезе единичных клеток и образовании «хвоста кометы» при непосредственном движении в агарозном геле. Далее ведется подсчет клеток, имеющих «хвост кометы», определяется длина «хвоста», диаметр головки и в совокупности длина «кометы». Имеет щелочную и нейтральную вариации. В то время, как щелочная обладает более высокой чувствительностью. Преимуществами данного метода, по мнению T. Hamilton с соавтор. (2016), выступает доступность, возможность определения одно- и двухцепочечных разрывов в ДНК, высокая чувствительность, возможность автоматизации процесса при помощи программного обеспечения и

специального оборудования [13].

SCD (Sperm Chromatin Dispersion test) — тест на дисперсию хроматина, в отличие от перечисленных выше двух методов, является непрямым (косвенным). Сущность заключается в следующем — ДНК спермы предварительно кислотом денатурируют, а мембрану и белки лизируют специальным раствором. Далее по образованию на подложке из агарозного геля специфического «венчика» или «halosperm» судят о наличии разрывов в ДНК. Ядра сперматозоидов с фрагментированной ДНК не образуют/образуют незначительный «венчик». После этого препараты окрашивают флуорохромом и просматривают вручную. Преимуществом данного метода выступает, в первую очередь, возможность определения степени фрагментации ДНК, а также доступность и простота в исполнении [10]. Исследователями Ram C. с соавтор. (2008) доказано, что в норме показатель уровня сперматозоидов с фрагментированной ДНК не превышает 20 % [21].

SCSA (Sperm Chromatin Structure Assay) — исследование дисперсии хроматина сперматозоидов, основанное на метахроматических свойствах красителя и денатурации ДНК в области разрывов под действием кислотного раствора, является непрямым методом. В данном анализе используются также флуоресцентные красители, а именно акридиновый оранжевый (АО). Краситель, как и в случае с методом TUNEL, связывается с концами участков разрыва цепей ДНК. В зависимости от интенсивности свечения судят о степени повреждения генетической со-

ставляющей, а сам акридиновый оранжевый при связывании с одноцепочечной молекулой ДНК даёт зеленое свечение, при связывании с двуцепочечной — красное. Для того, чтобы краситель проник внутрь хроматина сперматозоидов, Kadioglu A. с соавтор. (2017) используют высокую температуру и низкий pH [8]. Преимуществом данного метода является скорость выполнения. Данный метод одним из первых нашел применение в исследовании фрагментации ДНК сперматозоидов. К минусам относят высокую стоимость материалов и оборудования [12].

Кочконян А. А. (2022) в своей работе отмечает, что метод SCSA является более точным, удобным и быстрым, Kumaresan. A. с соавтор. (2019), напротив, выделяет метод Comet как самый точный из всех представленных методов [9, 25, 26].

Заключение. Следует отметить, что определение уровня фрагментации ДНК в сперматозоидах имеет важное значение для диагностики и прогнозирования проблем с репродукцией самцов-производителей. Данное исследование актуально для оценки спермопродукции высокоценных самцов-производителей в рамках дальнейшей реализации их генетического материала и формирования племенного ядра поголовья, а также в случаях бесплодия самцов неопределенного генеза, наличия эмбриональной смертности в анамнезе и безрезультативном проведении процедуры ЭКО, ИКСИ. Изучение фрагментации ДНК в сперматозоидах является эффективным дополнительным методом диагностики, который может выявить нарушения фертильности у самцов.

Литература

1. Agarwal A. Role of sperm chromatin abnormalities and DNA damage in male infertility / A. Agarwal, T. M. Said // Hum Reprod Update. — 2003. — № 9(4). — P. 331–45. Doi: 10.1093/humupd/dmg027.
2. Kumar K. Predictive value of DNA integrity analysis in idiopathic recurrent pregnancy loss following spontaneous conception / K. Kumar, D. Deka, A. Singh et al. // J Assist Reprod Genet. — 2012. — № 29(9). — P. 861–867. Doi: 10.1007/510815-012-9801-3.
3. Castro L. S. Effect of bovine sperm chromatin integrity evaluated using three different methods on in vitro fertility / L. S. Castro, A. F. P. Siqueira, T. R. D. S. Hamilton, C. M. Mendes, J. A. Visintin, M. E. O. A. Assumpcao // Theriogenology. (2018) 107:142–8. Doi: 10.1016/j.theriogenology.2017.11.006.
4. Baumber J. Reactive oxygen species and cryopreservation promote DNA fragmentation in equine spermatozoa / J. Baumber, B. A. Ball, J. J. Linfor, S. A. Meyers // J Androl. — 2003. — № 24. — P. 621–628. Doi: 10.1002/j.1939-4640.2003.tb02714.x.
5. Gonzalez-Marin C. Types, causes, detection and repair of DNA fragmentation in animal and human sperm cells / C. Gonzalez-Marin, J. Gosalvez, R. Roy // Int J Mol Sci. — 2012. — № 13. — 14026–14052. Doi: 10.3390/ijms131114026.
6. Гнездилова Л. А. Сравнительный анализ показателей криоконсервированной и свежеполученной спермы баранов-производителей романовской породы / Л. А. Гнездилова, А. А. Борунова, А. А. Кочконян // Вестник КРАСГАУ. — 2021. — № 10 (175). — С. 135–143.

7. Evenson D. P. Relationships between the age of 25,445 men attending infertility clinics and sperm chromatin structure assay (SCSA®) defined sperm DNA and chromatin integrity / D. P. Evenson, G. Djira, K. Kasperson, J. Christianson // *Fertil Steril.* — 2020. — №114(2). — P. 311–320. Doi: 10.1016/j.fertnstert.2020.03.028.
8. Kadioglu A. The role of sperm DNA testing on male infertility / A. Kadioglu, M. Ortac // *Transl Androl Urol.* — 2017. — № 6. — P. 600. Doi: 10.21037/tau.2017.03.82.
9. Kumaresan A. Sperm viability, reactive oxygen species, and DNA fragmentation index combined can discriminate between above-and below-average fertility bulls / A. Kumaresan, A. Johannisson, E. M. Al-Esawee, J. M. Morrell // *J Dairy Sci.* — 2017. — № 100. — P. 5824–5836. Doi: 10.3168/jds.2016-12484.
10. Cande C. Apoptosis-inducing factor (AIF): caspase-independent after all / C. Cande, N. Vahsen, C. Garrido // *Cell Death Differen.* — 2004. — № 11. — P. 591–595. Doi: 10.1038/sj.cdd.4401400.
11. Fortes M. R. S. Sperm protamine deficiency correlates with sperm DNA damage in Bos Indicus bulls / M. R. S. Fortes, N. Satake et al. // *Andrology.* — 2014. — № 2. — P. 370–378. Doi: 10.1111/j.2047-2927.2014.00196.x.
12. Gajski G. Application of the comet assay for the evaluation of DNA damage in mature sperm / G. Gajski, S. Ravlic et al. // *Mutation Research-Reviews in Mutation Research.* — 2021. — P. 788. Doi: 10.1016/j.mrrev.2021.108398.
13. Hamilton T., de Castro L. S. et al. Induced lipid peroxidation in ram sperm: semen profile, DNA fragmentation and antioxidant status, M. E. O. d'Avila Assumpcao, 2016.
14. Hirsh A. Male subfertility / A. Hirsh // *BMJ.* — 2003. — № 327. — P. 669–672. Doi: 10.1136/bmj.327.7416.669.
15. Lewis S. E. The impact of sperm DNA damage in assisted conception and beyond: recent advances in diagnosis and treatment / S. E. Lewis, R. J. Aitken et al. // *Reprod Biomed Online.* — 2013. — № 27. — P. 325–337. Doi: 10.1016/j.rbmo.2013.06.014.
16. Lopez-Fernandez C. Dynamics of Sperm DNA Fragmentation in Domestic Animals: II. The Stallion / C. Lopez-Fernandez, F. Crespo et al. // *Theriogenology.* — 2007. — № 68. — P. 1240–1250.
17. Schulte R. T. Sperm DNA damage in male infertility: etiologies, assays, and outcomes / R. T. Schulte, D. A. Ohl, M. Sigman, G. D. Smith // *J Assist Reprod Genet.* — 2010. — № 27. — P. 3–12. Doi: 10.1007/s10815-009-9359-x.
18. Pena F. J. Redox regulation and oxidative stress: the particular case of the stallion spermatozoa / F. J. Pena, C. O'Flaherty et al. // *Antioxidants.* — 2019. — № 8. — P. 67. Doi: 10.3390/antiox8110567.
19. Kuchakulla M., Narasimman M. et al. How defective spermatogenesis affects sperm DNA integrity / M. Kuchakulla, M. Narasimman et al. // *Andrologia.* — 2020. — e13615. Doi: 10.1111/and.13615.
20. Peris-Frau P. Comparative evaluation of DNA integrity using sperm chromatin structure assay and Sperm-Ovis-Halamax during in vitro capacitation of cryopreserved ram spermatozoa / P. Peris-Frau, M. Alvarez-Rodriguez et al. // *Reprod Domestic Anim.* — 2019. — № 54. — P. 46–49. Doi: 10.1111/rda.13519.
21. Ram. C. Lopez-Fernandez, J. L. Fernandez et al. Dynamics of sperm DNA fragmentation in domestic animals III. LessPublished in *Theriogenology*, 2008.
22. Tesarik J. Late, but not early, paternal effect on human embryo development is related to sperm DNA fragmentation / J. Tesarik, E. Greco, C. Mendoza // *Hum Reprod.* — 2004. — № 19. — P. 611–615. Doi: 10.1093/humrep/deh127.
23. Thippeswamy V. B. Effects of pedigree and exotic genetic inheritance on semen production traits of dairy bulls / V. B. Thippeswamy, S. S. Layek et al. // *Asian Pacific J Reprod.* — 2014. — № 3. — P. 13–17. Doi: 10.1016/S2305-0500(13)60178-5.
24. Абонеев В. В. Воспроизводительные качества тонкорунных овец при разных технологиях содержания / В. В. Абонеев и др. // *Актуальные проблемы интенсивного развития животноводства.* — 2021. — №24-1. — С. 36–43.
25. Кочконян А. А. Морфофункциональные характеристики спермопродукции баранов-производителей романовской породы: автореф. на соиск. ученой степ. канд. вет. наук: 06.02.06 — ветеринарное акушерство и биотехника репродукции животных. — М, 2022. — 24 с.
26. Vince S., Zaja I. et al. Age-related differences of semen quality, seminal plasma, and spermatozoa antioxidative and oxidative stress variables in bulls during cold and warm periods of the year. less Published in *Animal*, 2017.

Shubina M., Korochkina E.

DNA fragmentation in spermatozoa of mammals and methods of its investigation (review)

Abstract.

Purpose: systematization and analysis of scientific information on DNA fragmentation of spermatozoa of farm animals and methods of its research.

Not long ago, one of the factors that negatively affects the fertility of male producers was discovered - fragmentation of sperm DNA. Numerous studies have established that DNA fragmentation is the breaking of DNA strands into pieces. According to Agarwal A. (2003), sperm DNA fragmentation is the most common disorder of sperm ultrastructure. According to Baumber J. et al. (2003) determination of sperm DNA fragmentation is currently one of the modern methods for assessing sperm quality. Numerous studies have generated a pool of data on factors causing DNA fragmentation in sperm. Thus, Baumber J. et al. (2003) in their studies indicates that the cause of DNA fragmentation may be problems with chromatin remodeling, apoptosis and oxidative processes in sperm. Research conducted by Aboneev V.V. with coauthor. (2021) found that in severe forms of pathozoospermia, the number of sperm with fragmented DNA is higher than in less severe disorders of spermatogenesis [24]. The appearance of abnormal and inactive sperm in the ejaculate is one of the indirect markers of an increase in the index of DNA fragmentation in sperm, which negatively affects fertilizing ability of sperm. In this regard, the study of sperm DNA fragmentation is an effective diagnostic method for determining fertility. Considering some pathophysiological aspects leading to DNA fragmentation, determining the index of this process a priori cannot be routine. Currently, such high-precision methods as TTUNEL (terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP nick end labeling) — marking the ends of a broken molecule, SSCSA (Sperm Chromatin Structure Assay) — study of sperm chromatin dispersion, Comet (Single-cell gel electrophoresis assay, Cometassay) — capable of identifying breaks in single cells, SCD (Sperm Chromatin Dis) — are actively used. persiontest) — chromatin dispersion test, etc.

Key words: DNA fragmentation; spermatozoa; mammals, evaluation methods.

Authors:

Shubina M. — student; e-mail: maris.shubi@yandex.ru;

Korochkina E. — Dr Habil. (Vet. Sci.), Associate Professor; e-mail: e.kora@mail.ru.

St. Petersburg State University of Veterinary Medicine; 196084, Russia, St. Petersburg, Chernigovskaya str., 5.

References

1. Agarwal A. Role of sperm chromatin abnormalities and DNA damage in male infertility / A. Agarwal, T. M. Said // Hum Reprod Update. — 2003. — № 9(4). — P. 331–45. Doi: 10.1093/humupd/dmg027.
2. Kumar K. Predictive value of DNA integrity analysis in idiopathic recurrent pregnancy loss following spontaneous conception / K. Kumar, D. Deka, A. Singh et al. // J Assist Reprod Genet. — 2012. — № 29(9). — 861–867. Doi: 10.1007/510815-012-9801-3.
3. Castro L. S. Effect of bovine sperm chromatin integrity evaluated using three different methods on in vitro fertility / L. S. Castro, A. F. P. Siqueira, T. R. D. S. Hamilton, C. M. Mendes, J. A. Visintin, M. E. O. A. Assumpcao // Theriogenology. (2018) 107:142–8. Doi: 10.1016/j.theriogenology.2017.11.006.
4. Baumber J. Reactive oxygen species and cryopreservation promote DNA fragmentation in equine spermatozoa / J. Baumber, B. A. Ball, J. J. Linfor, S. A. Meyers // J Androl. — 2003. — № 24. — P. 621–628. Doi: 10.1002/j.1939-4640.2003.tb02714.x.
5. Gonzalez-Marin C. Types, causes, detection and repair of DNA fragmentation in animal and human sperm cells / C. Gonzalez-Marin, J. Gosalvez, R. Roy // Int J Mol Sci. — 2012. — № 13. — P. 14026–14052. Doi: 10.3390/ijms131114026.
6. Gnezdilova L. A. Comparative analysis of the indicators of cryopreserved and freshly obtained sperm of rams of the Romanov breed / L. A. Gnezdilova, A. A. Borunova, A. A. Kochkonyan // Bulletin of KRASGAU. — 2021. — № 10 (175). — P. 135–143.

7. Evenson D. P. Relationships between the age of 25,445 men attending infertility clinics and sperm chromatin structure assay (SCSA®) defined sperm DNA and chromatin integrity / D. P. Evenson, G. Djira, K. Kaspersen, J. Christianson // *Fertil Steril.* — 2020. — № 114(2). — P. 311–320.
8. Kadioglu A. The role of sperm DNA testing on male infertility / A. Kadioglu, M. Ortac // *Transl Androl Urol.* — 2017. — № 6. — P. 600. Doi: 10.21037/tau.2017.03.82.
9. Kumaresan A. Sperm viability, reactive oxygen species, and DNA fragmentation index combined can discriminate between above-and below-average fertility bulls / A. Kumaresan, A. Johannisson, E. M. Al-Essawe, J. M. Morrell // *J Dairy Sci.* — 2017. — № 100. — P. 5824–5836. Doi: 10.3168/jds.2016-12484.
10. Cande C. Apoptosis-inducing factor (AIF): caspase-independent after all / C. Cande, N. Vahsen, C. Garrido // *Cell Death Differen.* — 2004. — № 11. — P. 591–595. Doi: 10.1038/sj.cdd.4401400.
11. Fortes M. R. S. Sperm protamine deficiency correlates with sperm DNA damage in *Bos Indicus* bulls / M. R. S. Fortes, N. Satake et al. // *Andrology.* — 2014. — № 2. — P. 370–378. Doi: 10.1111/j.2047-2927.2014.00196.x.
12. Gajski G. Application of the comet assay for the evaluation of DNA damage in mature sperm / G. Gajski, S. Ravlic et al. // *Mutation Research-Reviews in Mutation Research.* — 2021. — P. 788. Doi: 10.1016/j.mrrev.2021.108398.
13. Hamilton T., de Castro L. S. et al. Induced lipid peroxidation in ram sperm: semen profile, DNA fragmentation and antioxidant status, M. E. O. d'Avila Assumpcao, 2016.
14. Hirsh A. Male subfertility / A. Hirsh // *BMJ.* — 2003. — № 327. — P. 669–672. Doi: 10.1136/bmj.327.7416.669.
15. Lewis S. E. The impact of sperm DNA damage in assisted conception and beyond: recent advances in diagnosis and treatment / S. E. Lewis, R. J. Aitken et al. // *Reprod Biomed Online.* — 2013. — № 27. — P. 325–37. Doi: 10.1016/j.rbmo.2013.06.014.
16. Lopez-Fernandez C. Dynamics of Sperm DNA Fragmentation in Domestic Animals: II. The Stallion / C. Lopez-Fernandez, F. Crespo et al. // *Theriogenology.* — 2007. — № 68. — P. 1240–1250.
17. Schulte R. T. Sperm DNA damage in male infertility: etiologies, assays, and outcomes / R. T. Schulte, D. A. Ohl, M. Sigman, G. D. Smith // *J Assist Reprod Genet.* — 2010. — № 27. — P. 3–12. Doi: 10.1007/s10815-009-9359-x.
18. Pena F. J. Redox regulation and oxidative stress: the particular case of the stallion spermatozoa / F. J. Pena, C. O'Flaherty et al. // *Antioxidants.* — 2019. — № 8. — P. 67. Doi: 10.3390/antiox8110567.
19. Kuchakulla M., Narasimman M. et al. How defective spermatogenesis affects sperm DNA integrity / M. Kuchakulla, M. Narasimman et al. // *Andrologia.* — 2020. — e13615. Doi: 10.1111/and.13615.
20. Peris-Frau P. Comparative evaluation of DNA integrity using sperm chromatin structure assay and Sperm-Ovis-Halomax during in vitro capacitation of cryopreserved ram spermatozoa / P. Peris-Frau, M. Alvarez-Rodriguez et al. // *Reprod Domestic Anim.* — 2019. — № 54. — P. 46–49. Doi: 10.1111/rda.13519.
21. Ram. C. Lopez-Fernandez, J. L. Fernandez et al. Dynamics of sperm DNA fragmentation in domestic animals III. LessPublished in *Theriogenology*, 2008.
22. Tesarik J. Late, but not early, paternal effect on human embryo development is related to sperm DNA fragmentation / J. Tesarik, E. Greco, C. Mendoza // *Hum Reprod.* — 2004. — № 19. — P. 611–615. Doi: 10.1093/humrep/deh127.
23. Thippeswamy V. B. Effects of pedigree and exotic genetic inheritance on semen production traits of dairy bulls / V. B. Thippeswamy, S. S. Layek et al. // *Asian Pacific J Reprod.* — 2014. — № 3. — P. 13–17. Doi: 10.1016/S2305-0500(13)60178-5.
24. Aboneev V. V. Reproductive qualities of fine-wool sheep under different housing technologies / V. V. Aboneev et al. // *Current problems of intensive development of livestock breeding.* — 2021. — № 24-1. — P. 36–43.
25. Kochkonyan A. A. Morphofunctional characteristics of sperm production of rams of the Romanov breed: abstract. for the job application scientific degree Ph.D. vet. Sciences: 02/06/06 – veterinary obstetrics and biotechnology of animal reproduction. — M, 2022. — 24 p.
26. Vince S., Zaja I. et al. Age-related differences of semen quality, seminal plasma, and spermatozoa antioxidant and oxidative stress variables in bulls during cold and warm periods of the year. less Published in *Animal*, 2017.