

ОРИГИНАЛЬНЫЕ СТАТЬИ

Original Articles

Научная статья

УДК 616.699

DOI: 10.14489/lcmp.2022.03.pp.037-056

ОЦЕНКА ДИСПЕРСИИ ДНК-ФРАГМЕНТОВ СПЕРМАТОЗОИДОВ У МУЖЧИН С БЕСПЛОДИЕМ: ИЗ КЛИНИЧЕСКИХ ИССЛЕДОВАНИЙ ПЕРВОГО РОССИЙСКОГО НАБОРА ГЕМСТАНДАРТ–ГАЛОСПЕРМ Л&К

Ж. Ю. Сапожкова^{1, 2}, К. И. Еремин¹, О. И. Пацап³¹Международная Школа Цитологии и Медицинская Школа Инноваций, Москва, Россия, icsschool.2019@gmail.com²Подольский диагностический центр, клинко-диагностическая лаборатория, Подольск, Россия³Научно-образовательный ресурсный центр инновационных технологий иммунофенотипирования, цифрового пространственного профилирования и ультраструктурного анализа (молекулярной морфологии), ФГАОУ ВО «Российский университет дружбы народов», Москва, Россия

Цель исследования. Провести оценку дисперсии ДНК-фрагментов сперматозоидов у мужчин с бесплодием с помощью первого российского набора реагентов.

Материал и методы. За период июль–август 2022 г. 492 образца эякулята мужчин в возрасте от 23 до 59 лет с бесплодием были исследованы с помощью набора ГЕМСТАНДАРТ–ГалоСперм Л&К (далее, Набор или Гало-тест). Полученные результаты выражали в процентах как индекс фрагментации ДНК сперматозоидов (ФДНКС) или *DFI*, % (DNA Fragmentation Index). Проводили оценку результатов Гало-теста согласно следующим пороговым значениям: норма: $DFI \leq 15\%$, сомнительный результат: $DFI > 15\%$ до $< 25\%$, патология: $DFI > 25\%$. За месяц до выполнения Гало-теста, все обследуемые мужчины ($n = 492$) получили результаты спермограммы, где были выявлены различные сценарии патоспермии, а также нормоспермия. Статистическую обработку результатов проводили с помощью GraphPad Prism 8.0.1 и Microsoft® Excel® для Microsoft 365 MSO (версия 2201), использовали коэффициент корреляции Пирсона для параметрической статистики, описательная статистика.

Результаты. Отсутствие ФДНКС было установлено у 54,1 % (266/492 = 54,1 %) мужчин, средний возраст которых составил 36,58 лет ($DFI \leq 15\%$); отмечена слабая прямая корреляция между нормальным уровнем ФДНКС и астенозооспермией ($r = 0,20$; $p < 0,0001$) и вискозипатией ($r = 0,13$; $p < 0,0001$); слабая обратная корреляция с олигоастенотератозооспермией ($r = -0,12$; $p < 0,0001$); отмечено отсутствие пиоспермии.

Сомнительный результат по наличию ФДНКС установлен у 21,3 % (105/492 = 21,3 %) мужчин, средний возраст которых составил 38,71 года (DFI в диапазоне от > 15 до $< 25\%$); отмечена слабая прямая корреляция между сомнительным уровнем ФДНКС и олигоастенотератозооспермией ($r = 0,24$; $p < 0,0001$), олигоспермией ($r = 0,23$; $p < 0,0001$) и средним возрастом 39 лет ($r = 0,17$; $p < 0,0001$); слабая обратная зависимость с астенозооспермией ($r = -0,22$; $p < 0,0001$).

ФДНКС была обнаружена у 24,6 % (121/492 = 24,6 %) мужчин, средний возраст которых составил 41,55 года ($DFI > 25\%$); отмечена слабая прямая корреляция между высоким уровнем ФДНКС и средним возрастом 44 года ($r = 0,28$; $p < 0,0001$).

Во всей обследуемой выборке бесплодных мужчин ($n = 492$) установлена слабая прямая корреляция между уровнем ФДНКС и возрастом ($r = 0,1563$; $p = 0,0005$), олиастенотератозооспермией ($r = 0,19$; $p < 0,0001$), пиоспермией ($r = 0,29$; $p < 0,0001$) и некрозооспермией ($r = 0,16$; $p = 0,0004$).

Заключение. Результаты настоящего исследования показали, что набор ГЕМСТАНДАРТ–ГалоСперм Л&К дополняет рутинную спермограмму, предоставляя конкретную информацию клиницисту о качестве генетического материала эякулята.

Ключевые слова: ГалоСперм, фрагментация ДНК сперматозоидов, мужское бесплодие, тест на дисперсию ДНК сперматозоидов (Гало-тест), оксидативный стресс, пиоспермия, вспомогательные репродуктивные технологии (ВРТ).

Для цитирования: Сапожкова Ж. Ю., Еремин К. И., Пацап О. И. Оценка дисперсии ДНК-фрагментов сперматозоидов у мужчин с бесплодием: из клинических исследований первого российского набора GEMSTANDART–ГалоСперм Л&К // Лабораторная и клиническая медицина. Фармация. 2022. Т. 2, № 3. С. 37 – 56. DOI: 10.14489/lcmp.2022.03.pp.037-056

Research Article

SPERM CHROMATIN DISPERSION TEST FOR EXAMINATION OF INFERTILE MALE: FROM CLINICAL TRIALS OF FIRST RUSSIAN KIT GEMSTANDART–HALOSPERM L&Q

Zh. Yu. Sapozhkova^{1,2}, K. I. Eremin¹, O. I. Patsap³

¹International Cytology School & Innovatory Medical School, Moscow, Russia

²Podolsk Diagnostic Center, Medical Laboratory, Podolsk, Russia

³Scientific and Educational Resource Center for Innovative Technologies of Immunophenotyping, Digital Spatial Profiling and Ultrastructural Analysis (Molecular Morphology), FSAOU VO "Peoples' Friendship University of Russia", Moscow, Russia

Objectives. To evaluate the sperm chromatin dispersion in men with infertility using the first Russian kit.

Methods. The study was conducted between July and August 2022. Study participants were 492 male volunteers aged 23 to 59 years with infertility which semen samples were examined by GEMSTANDART–HaloSperm L&Q kit so-called Halo test. The outcomes were as a percentage as the sperm DNA Fragmentation Index (DFI), %. The results of Halo test were evaluated according to the following threshold values: in reference range (normal): $DFI \leq 15\%$, controversial result: from $DFI > 15\%$ to $< 25\%$, out of reference range (pathological) $DFI > 25\%$. All of men ($n = 492$) had the results of a basic semen examination which performed a month before the current clinical trials with a various scenario of pathospermia as well as normospermia. The statistical processed a GraphPad Prism software (version 8.0.1) and Excel statistical package Microsoft® Excel® for Microsoft 365 MSO (verse 2201 16.0.14827.20158). The Pearson's rank correlation coefficient of parametric measure and descriptive statistics have been applied.

Results. Sperm DNA fragmentation (SDF) was not detected in 54.1 % ($266/492 = 54.1\%$) men whose average age was 36.58 years ($DFI \leq 15\%$); a poor direct correlation with normal level of DFI and asthenozoospermia ($r = 0.20$; $p < 0.0001$), viscosipathy ($r = 0.13$; $p < 0.0001$) are presented; a poor inverse correlation with oligoasthenoteratozoospermia ($r = -0.12$; $p < 0.0001$) are presented; the absence of leucospermia was noted.

A controversial results for SDF presence was found in 21.3 % ($105/492 = 21.3\%$) men whose average age was 38.71 years (DFI range from > 15 to $< 25\%$); a poor direct correlation with oligoasthenoteratozoospermia ($r = 0.24$; $p < 0.0001$), oligospermia ($r = 0.23$; $p < 0.0001$) and average age of 39 years ($r = 0.17$; $p < 0.0001$) was noted; poor inverse correlation with asthenozoospermia ($r = -0.22$; $p < 0.0001$) was presented.

SDF was found in 24.6 % ($121/492 = 24.6\%$) men whose average age was 41.55 ($DFI > 25\%$); poor direct correlation with a high level of DFI and average age for infertile men in 44 years ($r = 0.28$; $p < 0.0001$) was presented.

All semen samples ($n = 492$) presented a poor positive correlation with DFI and age ($r = 0.1563$; $p = 0.0005$); oliasthenoteratozoospermia ($r = 0.19$; $p = 0.0001$), leucospermia ($r = 0.29$; $p = 0.0001$), and necrozoospermia ($r = 0.16$; $p = 0.0004$).

Conclusion. The results of the study showed that GEMSTANDART–HaloSperm L&Q kit complements a basic semen examination providing specific information to the clinicians about quality of genetic material in semen samples.

Key words: Halosperm, sperm DNA damage, male infertility, sperm chromatin dispersion (SCD) test, oxidative stress, leucospermia, assisted reproductive technology (ART).

For citation: Sapozhkova ZhYu, Eremin KI, Patsap OI. Sperm Chromatin Dispersion Test for Examination of Infertile Male: From Clinical Trials of First Russian Kit GEMSTANDART–HaloSperm L&Q. *Laboratory and Clinical Medicine. Pharmacy.* 2022;2(3):37-56. (In Russ). DOI: 10.14489/lcmp.2022.03.pp.037-056

Введение

Упаковка ДНК в головке сперматозоида является результатом сложного процесса, требующего значительного уплотнения и перераспределения хроматина на заключительных стадиях сперматогенеза. Нормальная ДНК зрелых сперматозоидов

обладает высокой устойчивостью к физической или химической денатурации. Сегодня известны три механизма, которые могут объяснить повреждение ДНК сперматозоидов: дефектная конденсация хроматина во время сперматогенеза [1]; апоптоз [2] и окислительный стресс (ОС) [3],

которому легко подвержены сперматозоиды человека из-за влияния системных факторов (пожилой возраст, коморбидность – сахарный диабет, рак, варикоцеле и др.) и образа жизни (ожирение, курение, лекарства, ксенобиотики, экология, частота эякуляции и др.) [4 – 7].

Базовый анализ эякулята (спермограмма) остается основным тестом для оценки мужского бесплодия, но прогностическая значимость обычных параметров спермограммы (количества сперматозоидов, подвижности, морфологии) невелика, поскольку им присущи высокая внутри- и межлабораторная вариабельность и низкая предсказательная ценность [8]. Спермограмма не может оценить повреждение хроматина сперматозоидов, в то время как научные исследования и клиническая практика указывают на то, что целостность ДНК сперматозоидов влияет на их функциональные возможности, подчеркивая тем самым важность тестов на ФДНКС для оценки нарушений фертильности [9, 10]. В этой связи, наряду с базовым анализом эякулята, Всемирная организация здравоохранения (ВОЗ) рекомендует проводить дополнительное исследование спермы с помощью тестов для выявления ОС и ФДНКС [11].

Со времен зарождения вспомогательных репродуктивных технологий (ВРТ) и по настоящее время ФДНКС считали одной из основных причин мужского бесплодия по причине нарушения оплодотворения, имплантации, продукции эмбрионов

плохого качества, увеличения частоты самопроизвольных абортс и снижения частоты наступления беременности при ВРТ [8, 12 – 17].

Для оценки целостности хроматина сперматозоидов известна линейка методов и тестов с различной степенью диагностических и прогностических возможностей:

1) *тесты для оценки повреждений ДНК* – структурный анализ хроматина сперматозоидов (SCSA/sperm chromatin structure assay); идентификация фрагментов поврежденных ДНК (одиночный или двойной разрыв), меченных dUTP с помощью терминальной дезоксирибонуклеотидилтрансферазы (TUNEL/nick-end labeling of dUTP using terminal deoxynucleotidyl transferase); оценка дисперсии хроматина (SCD/sperm chromatin dispersion test) или Гало-тест (halo assay); гелеэлектрофорез отдельных клеток (SCGE/single-cell gel electrophoresis или Comet assay);

2) *тесты для оценки качества конденсации хроматина* – окрашивание анилиновым синим (aniline blue/AB); окрашивание хромомицином А3 (chromomycin A3/CMA3); окрашивание акридин-оранжевым (acridine orange staining/AO) [10, 18, 19]. Все эти методы различаются по своей диагностической точности (чувствительности, специфичности) и клинической ценности из-за присущих каждому из них преимуществ и недостатков, связанных с различными технологиями выявления повреждений ДНК сперматозоидов [10, 20] (табл. 1).

Таблица 1 / Table 1

Сравнение тестов фрагментации ДНК /
Comparison of DNA fragmentation assays

Линейка методов/ Methods line	Тест/ Assay	Принцип метода/ Principle of method	Оборудование/ Devise	Преимущества/ Advantages	Недостатки/ Disadvantages
Тесты для оценки повреждений ДНК/ DNA damage assay	TUNEL	Подсчет энзиматической инкорпорации dUTP в ДНК-разрыв. Флуоресцентное мечение одно- и двуниевых разрывов ДНК. Интенсивность люминесценции пропорциональна числу встроенных dUTP и, соответственно, числу разрывов ДНК. В качестве флуорохрома обычно используется флуоресцеин. Рассчитывают процент TUNEL-позитивных клеток	1) микроскоп светлопольный или 2) микроскоп, флуоресцентный или 3) анализатор проточной цитофлуометрии	– может быть выполнен с несколькими сперматозоидами; – минимальная вариабельность; – высокая чувствительность и специфичность; – возможность подсчета большого количества сперматозоидов	1) необходимость специального оборудования; 2) высокая стоимость; 3) требуется внутрилабораторная стандартизация

Продолжение таблицы 1 / Continuation of Table 1

Линейка методов/ Methods line	Тест/ Assay	Принцип метода/ Principle of method	Оборудование/ Devise	Преимущества/ Advantages	Недостатки/ Disadvantages
Тесты для оценки повреждений ДНК/ DNA damage assay	SCD/ Halo assay	Оценка дисперсии фрагментов ДНК после денатурации	1) микроскоп светлопольный или 2) микроскоп, флуоресцентный или	Простой в исполнении метод	Необходимость специальной подготовки лаборанта
	SCGE / Comet assay	Электрофоретическая оценка фрагментов или лизированной ДНК. Позволяет определить содержание высоко- и низкомолекулярной ДНК по ореолу низкомолекулярной ДНК, напоминающему хвост кометы и получаемому при мини-электрофорезе клеток, иммобилизованных в агарозном геле. Проводят специальную обработку клеток с использованием протеиназы. Подсчитывают число клеток с «хвостом кометы» относительно общего числа клеток; также измеряют длину «хвоста»	1) оборудование для гель-электрофореза 2) флуоресцентный микроскоп	– подходит для образцов с низким числом сперматозоидов; – метод чувствительный и с хорошей воспроизводимостью	1) требует опыта выполнения; 2) присутствует внутрилабораторная вариабельность результатов
	SC-SA	Измерение предрасположенности повреждения ДНК при денатурации. Основан на метахроматических свойствах акридинового оранжевого, который флюоресцирует красным при связывании с одноцепочечной молекулой ДНК и зеленым – при связывании с двухцепочечной. Для проникновения акридинового оранжевого в хроматин сперматозоидов используют высокие температуры и низкий pH, приводящие к деконденсации нуклеопротеидной структуры	Анализатор проточной цитофлуометрии	– невысокая стоимость; – высокая чувствительность; – возможность количественного анализа поврежденного ДНК в отдельных клетках; – оценка различных типов повреждений ДНК	1) требуется дорогостоящее оборудование; 2) высокий профессионализм сотрудников; 3) высокая стоимость

Окончание таблицы 1 / End of table 1

Линейка методов/ Methods line	Тест/ Assay	Принцип метода/ Principle of method	Оборудование/ Devise	Преимущества/ Advantages	Недостатки/ Disadvantages
Тесты для оценки качества конденсации хроматина/ Assays for evaluation quality of chromatin condensation	АО	Метахромный сдвиг флуоресценции на АО, когда происходит процесс разрыва до одностандартной ДНК (ssDNA). Используется флуоресцентная микроскопия	Флуоресцентный микроскоп	Быстрый, простой в исполнении и недорогой	Присутствует внутрилабораторная вариабельность результатов
	СМАЗ	СМАЗ конкурентоспособное связывание с ДНК, непрямого визуализация протамин-дефицит в ДНК	Микроскоп светлопольный	Надежные результаты, четкая корреляция с другими методами оценки	Присутствует внутрилабораторная вариабельность результатов
	АВ	Установление усиленной связи к АВ-окрашиванию при потере хроматина ядра сперматозоида; изучение зрелости хроматина	Микроскоп светлопольный	Быстрый, простой, недорогой	Присутствует внутрилабораторная вариабельность результатов

В настоящее время не определен идеальный метод измерения ФДНКС и его оптимальные пороговые значения, но четыре основных теста – TUNEL, SC-SA, SCGE/Comet assay и SCD/Halo assay/Гало-тест кажутся надежными для получения информации о качестве ДНК сперматозоидов, что важно для установления мужского фактора бесплодия [19, 21].

В то время как во всем мире проводят сравнительный анализ широко представленных и сертифицированных коммерчески доступных реагентов для определения ФДНКС, в лабораторной медицине России не существует реагентов с разрешительными документами Росздравнадзора для использования в медицинских целях. К тому же, с каждым годом лабораторные исследования для выявления ФДНК становятся все более востребованы среди врачей репродуктивной медицины, урологов-андрологов, гинекологов. Диагностическая точность результатов анализов при бесплодии, основанная на тестах для использования только в научных целях (без регистрационного удостоверения, далее РУ), не подтверждена, что может привести к противоречивым результатам, неверной лечебной тактике, отсутствию результативности естественных или вспомогательных репродуктивных методов.

Для поддержания национальной концепции здоровьесбережения семьи российскими учеными и практикующими специалистами лабораторной медицины был разработан и произведен первый отечественный набор реагентов для оценки дисперсии фрагментов ДНК после денатурации – ГЕМСТАНДАРТ–ГалоСперм Л&К находящийся (на момент публикации статьи) на этапе клинических предрегистрационных испытаний (ООО «ГЕМСТАНДАРТ», г. С-Петербург, ООО Компания Л энд К/Международная Школа Цитологии & Медицинская Школа Инноваций, г. Москва). Российская разработка относится к самой востребованной и простой технологии – тесту для оценки повреждений ДНК – Гало-тесту.

Материалы и методы

За период июль–август 2022 г. на клинической базе Международной Школы Цитологии & Медицинской Школы Инноваций (г. Москва) проведено одномоментное исследование, в котором диагностический метод применялся в одинаковых условиях ко всем обследуемым добровольцам мужского пола в количестве 492 человека. Средний возраст обследуемых мужчин 38,28 года (стандартное отклонение 8,64; медиана возраста 38 лет, минимальный возраст 23 года, максимальный возраст 59 лет). Критерии включения в иссле-

дование: наличие у пациентов жалоб на неудачные попытки зачатия на протяжении 1 – 5 лет, соблюдение полового воздержания в течение 3 – 5 суток; отсутствие активных жалоб, характерных для MAGI (male accessory gland infections/инфекций мужских добавочных половых желез) и(или) в анамнезе MAGI, а именно специфический или неспецифический уретрит, хронический или острый простатит, орхит, эпидидимит. Критерии исключения: азооспермия, криптозооспермия, применение антибактериальных, противовирусных препаратов в последние 4 недели до обследования; использование местных лекарственных препаратов в течение 3 недель, предшествующих обследованию; наличие у пациентов синдрома хронической тазовой боли, симптомов нижних мочевых путей, синдрома хронической мошоночной боли, наличие эректильной дисфункции; отсутствие нарушений кариотипа, микроделеций AZF локуса Y-хромосомы, мутаций гена *CFTR*; наличие у пациентов сексуальных партнеров – женщин с рецидивирующими нарушениями влагалищного биоценоза, с воспалительными заболеваниями органов малого таза. Выбывших из исследования пациентов не было. Все добровольцы подписали информированное добровольное согласие на участие в исследовании.

За месяц до выполнения Гало-теста все обследуемые мужчины ($n = 492$) получили результаты спермограммы, где были выявлены различные сценарии патоспермии, а также нормоспермия. В рамках научных исследований и клинических разработок для установления причины бесплодия всем добровольцам было выполнено исследование эякулята на ФДНКС на предварительно подготовленных образцах, препаратах спермы, собранных и доставленных в соответствии с рекомендациями ВОЗ 6-го издания (2021) [11]. Каждый образец эякулята разделяли на две части: одну часть в аликвоте 100 мкл использовали непосредственно для приготовления препаратов с последующим хранением и дальнейшим исследованием на ФДНКС, а оставшуюся часть использовали для спермограммы [22]. Обработку эякулята проводили согласно следующим этапам [22]:

- 1) аликвоту из 100 мкл свежего эякулята размещали на сухое одноразовое предметное стекло;
- 2) помещали стекло в термостат при 37 °С на 25 – 30 минут до полного высушивания аликвоты;
- 3) доставали из термостата предметное стекло с высушенной аликвотой и оставляли на 2 мин при комнатной температуре 22 °С;

4) помещали стеклопрепарат в герметичный пластиковый контейнер для хранения при температуре –22 °С на срок 28 дней для последующего отсроченного исследования;

5) через 28 дней хранения непосредственно перед оценкой ФДНКС доставали из пластикового контейнера замороженные высушенные на воздухе стеклопрепараты, оставляли их до комнатной температуры 22 °С;

6) добавляли в высушенные аликвоты эякулята по 50 мкл восстанавливающей жидкости (фосфатно-солевого буферного раствора);

7) аккуратно перемешивали наконечником пипетки до образования однородной суспензии;

8) полученную суспензию помещали в коническую микропробирку типа Эппендорф объемом 0,5 мл;

9) использовали подготовленный образец эякулята для дальнейшего анализа с помощью Набора в формате 20 определений (комплектация 2).

В состав Набора входит:

1) пробирка типа Эппендорф с легкоплавкой агарозой (Реагент № 1) – 10 шт.;

2) фосфатно-солевой буферный раствор (Реагент № 2) 50 мл;

3) денатурирующий раствор (Реагент № 3) 100 мл;

4) лизирующий раствор (Реагент № 4) 100 мл;

5) дегидратирующий раствор 1 (Реагент № 5) 50 мл;

6) дегидратирующий раствор 2 (Реагент № 6) 50 мл;

7) дегидратирующий раствор 3 (Реагент № 7) 50 мл;

8) раствор для фиксирования и предокрашивания (Реагент № 8) 50 мл;

9) окрашивающий раствор «розовый» (Реагент № 9) 50 мл;

10) окрашивающий раствор «синий» (Реагент № 10) 50 мл.

Согласно инструкции к Набору, перед размещением на предметное стекло с предварительно нанесенным покрытием (с положительно заряженной поверхностью) для обеспечения наилучшего прикрепления клеточного материала к поверхности образцы смешивали с инертным агарозным микрогелем, охлаждали и подвергали воздействию денатурирующего агента и лизирующего раствора. Затем предметные стекла окрашивали и оценивали ФДНКС путем подсчета на лабораторном счетчике 300 сперматозоидов на образец с помощью светопольной микроскопии под иммерсионным объективом $\times 1000$ [23, 24].

Принцип действия Набора: интактные (неповрежденные/нефрагментированные/цельные) молекулы ДНК расширяются после денатурации и экстракции ядерных белков с образованием нуклеол с большими специфическими ореолами (гало) расплетенных петель ДНК, которые выходят из центрального ядра. При фрагментации ДНК (повреждении целостности) дисперсия не развивается или минимальна и сопровождается образованием нуклеол без ореола рассеивания, либо ореол (гало) слабо выражен.

Гало сперматозоидов в исследуемых препаратах классифицировали по 5 категориям согласно критериям Fernández et al. [23]:

1. **Фрагментация ДНК отсутствует, оптимальное качество эякулята** – нет разрывов/повреждения ядерной ДНК сперматозоидов.

Микроскопическая картина препарата: сперматозоиды с большим гало (Large/L) (сперматозоид, размер гало которого больше или такой же, как внутренний диаметр ядра) (рис. 1 (1)).

2. **Фрагментация ДНК присутствует, но без значимого влияния на эмбриогенез** – некоторые разрывы/повреждения ядерной ДНК сперматозоидов.

Микроскопическая картина препарата: сперматозоиды с гало среднего размера (Medium/M) (сперматозоид с гало, размер которого меньше большого гало и больше малого гало сперматозоида) (рис. 1 (2)).

3. **Фрагментация ДНК присутствует, субоптимальное качество эякулята** – значимые разрывы/повреждения ядерной ДНК сперматозоидов.

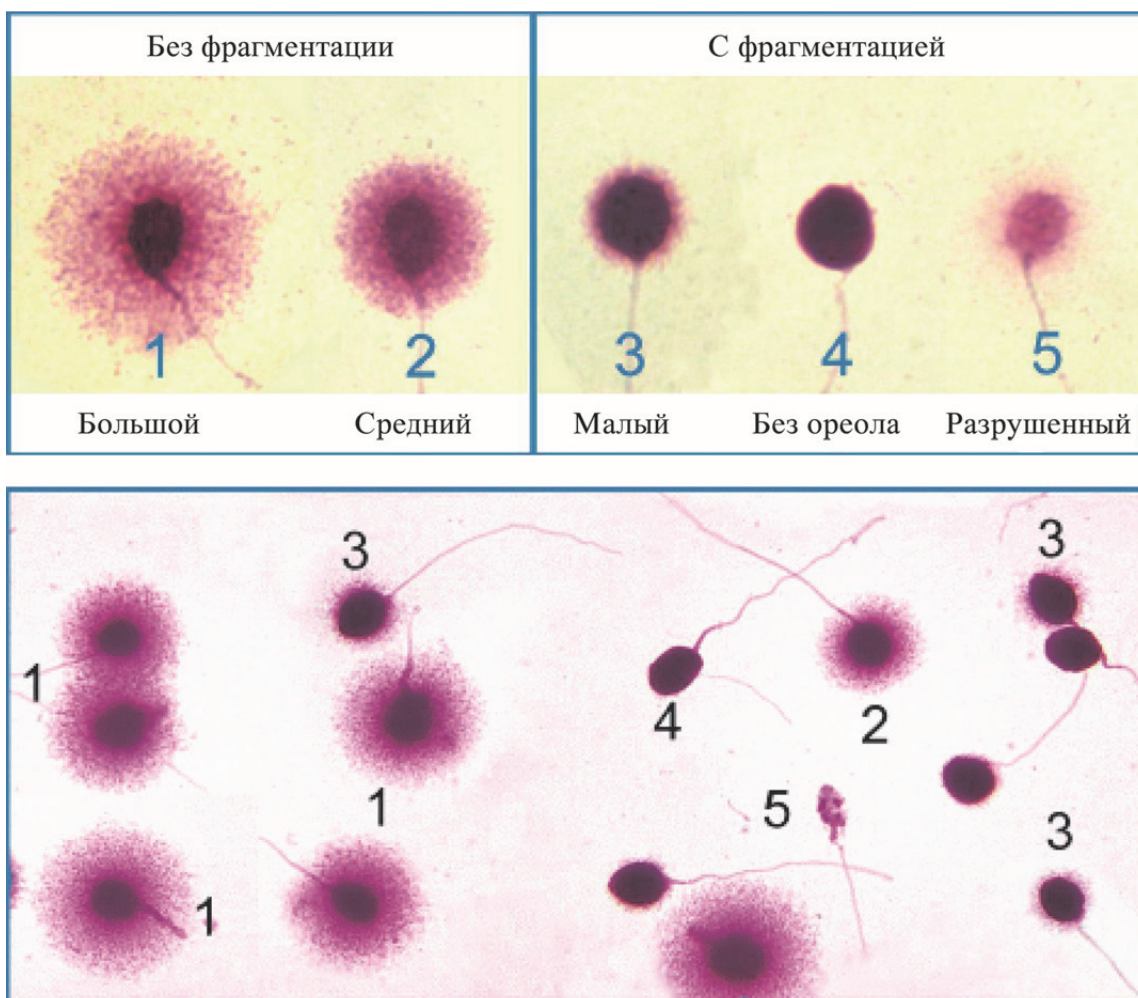


Рис. 1. Контрольная визуализация пяти оценочных категорий фрагментации ДНК сперматозоидов по Fernández et al.

Fig. 1. Check-up scoring of visualization of sperm DNA fragmentation according to five categories to Fernandez et al.

Микроскопическая картина препарата: сперматозоид с малым гало (Small/S) (сперматозоид, размер ореола которого меньше 1/3 или такой же, как внутренний диаметр ядра (рис. 1 (3)).

4. **Фрагментация ДНК присутствует, неоптимальное качество эякулята** – значимые разрывы/повреждения ядерной ДНК сперматозоидов.

Микроскопическая картина препарата: сперматозоид без гало (Without HALO/WH) (рис. 1 (4)).

5. **Фрагментация ДНК присутствует, эякулят низкого качества** – полная деградация ядерной ДНК сперматозоидов.

Микроскопическая картина препарата: разрушенный сперматозоид без гало (Without HALO – Degraded/WH) (сперматозоид без ореола и с ядром, которое неравномерно или слабо окрашено (рис. 1 (5)).

Проводили подсчет процентного содержания сперматозоидов с фрагментированным ДНК согласно следующей формуле:

$$DFI = \frac{S + WH + WHD}{N} \cdot 100 \%,$$

где *DFI* (DNA Fragmentation Index) – индекс фрагментации ДНК сперматозоидов; *S* – число сперматозоидов с малым гало; *WH* – число сперматозоидов без гало; *WHD* – число разрушенных сперматозоидов без гало; *N* – число исследуемых сперматозоидов.

Результаты анализа на отчете пациента записывали согласно следующим категориям:

Число исследуемых сперматозоидов (*N*), % _____
 Число сперматозоидов без фрагментации ДНК (*L + M*), % _____
 Число сперматозоидов с фрагментацией ДНК (*S + WH*), % _____
 Число разрушенных/деградированных сперматозоидов (*WHD*), % _____
 Индекс фрагментации ДНК сперматозоидов (*DFI*), % _____

Проводили оценку результатов лабораторного анализа согласно следующим пороговым значениям:

Норма: $DFI \leq 15 \%$.

Сомнительный результат: DFI от > 15 до $< 25 \%$.

Патология: $DFI > 25 \%$.

Статистическую обработку результатов проводили с помощью GraphPad Prism 8.0.1 и Microsoft® Excel® для Microsoft 365 MSO (версия 2201 Сборка 16.0.14827.20158), использовали коэффициент корреляции Пирсона для параметрической статистики, описательную статистику.

Результаты

У **54,1 %** (266/492 = 54,1 %) мужчин, средний возраст которых составил 36,58 года (стандартное отклонение 8,12; медиана возраста 34 года, минимальный возраст 23 года, максимальный возраст 59 лет), **ФДНКС не была** выявлена ($DFI \leq 15 \%$). Согласно корреляционной матрице, у данной категории добровольцев была отмечена слабая прямая корреляция между низким уровнем ФДНКС и астенозооспермией ($r = 0,20$; $p < 0,0001$) и вискозитатией ($r = 0,13$; $p < 0,0001$), а также слабая обратная корреляция с олигоастенотератозооспермией ($r = -0,12$; $p < 0,0001$). Отмечено также отсутствие приоспермии у мужчин без ФДНКС (табл. 2).

У **21,3 %** (105/492 = 21,3 %) мужчин, средний возраст которых составил 38,71 года (стандартное отклонение 8,33; медиана возраста 39 лет, минимальный возраст 23 года, максимальный возраст 56 лет), выявлены **сомнительные значения ФДНКС** (DFI в диапазоне от > 15 до $< 25 \%$). Согласно корреляционной матрице, у данной категории добровольцев была отмечена слабая прямая корреляция между сомнительным уровнем ФДНКС и олигоастенотератозооспермией ($r = 0,24$; $p < 0,0001$), олигоспермией ($r = 0,23$; $p < 0,0001$) и средним возрастом бесплодных мужчин 39 лет ($r = 0,17$; $p < 0,0001$); слабая обратная зависимость с астенозооспермией ($r = -0,22$; $p < 0,0001$) (табл. 3).

У **24,6 %** (121/492 = 24,6 %) мужчин, средний возраст которых составил 41,55 года (стандартное отклонение 9,06; медиана возраста 43 года, минимальный возраст 23 года, максимальный возраст 59 лет), была выявлена **ФДНКС** ($DFI > 25 \%$). Согласно корреляционной матрице, у данной категории добровольцев была отмечена слабая прямая корреляция между уровнем ФДНКС и средним возрастом бесплодных мужчин 44 года ($r = 0,28$; $p < 0,0001$) (табл. 4).

Согласно анализу всей обследуемой выборки бесплодных мужчин ($n = 492$), установлена слабая прямая корреляция между возрастом мужчин и уровнем ФДНКС ($r = 0,1563$; $p = 0,0005$) (табл. 5).

Таблица 2 / Table 2

**Корреляционная матрица исследуемых параметров спермограммы
и уровнем $DFI \leq 15\%$, $n = 266$, коэффициент корреляции Пирсона r /**

Correlation matrix of the studied parameters of basic semen examination and $DFI \leq 15\%$, $n = 266$,
Pearson's rank correlation coefficient r

r	Возраст мужчины/ Male age	Параметр 1/ Parameter 1	Параметр 2/ Parameter 2	Параметр 3/ Parameter 3	Параметр 4/ Parameter 4	Параметр 5/ Parameter 5	Параметр 6/ Parameter 6	Параметр 7/ Parameter 7	Параметр 8/ Parameter 8	Параметр 9/ Parameter 9	Параметр 10/ Parameter 10	Параметр 11/ Parameter 11	Параметр 12/ Parameter 12
Возраст мужчины/ Male age	1,00	-0,13	-0,06	0,22	-0,13	-0,10	0,01		-0,04	-0,02	-0,06	0,00	0,04
Параметр 1/ Parameter 1	-0,13	1,00	-0,14	-0,57	-0,14	-0,32	-0,20		-0,03	-0,06	-0,13	-0,26	-0,08
Параметр 2/ Parameter 2	-0,06	-0,14	1,00	-0,33	-0,08	0,29	0,01		-0,02	-0,04	0,03	-0,15	-0,12
Параметр 3/ Parameter 3	0,22	-0,57	-0,33	1,00	-0,33	0,11	0,28		-0,07	0,11	0,29	0,29	0,20
Параметр 4/ Parameter 4	-0,13	-0,14	-0,08	-0,33	1,00	0,13	-0,11		-0,02	-0,04	-0,21	0,09	0,09
Параметр 5/ Parameter 5	-0,10	-0,32	0,29	0,11	0,13	1,00	0,44		-0,04	0,19	0,38	0,39	0,06
Параметр 6/ Parameter 6	0,01	-0,20	0,01	0,28	-0,11	0,44	1,00		-0,02	0,31	0,25	0,16	0,13
Параметр 7/ Parameter 7	Отсутствует												
Параметр 8/ Parameter 8	-0,04	-0,03	-0,02	-0,07	-0,02	-0,04	-0,02		1,00	-0,01	-0,05	-0,03	0,03
Параметр 9/ Parameter 9	-0,02	-0,06	-0,04	0,11	-0,04	0,19	0,31		-0,01	1,00	0,17	-0,06	0,06
Параметр 10/ Parameter 10	-0,06	-0,13	0,03	0,29	-0,21	0,38	0,25		-0,05	0,17	1,00	0,50	0,05
Параметр 11/ Parameter 11	0,00	-0,26	-0,15	0,29	0,09	0,39	0,16		-0,03	-0,06	0,50	1,00	0,09
Параметр 12/ Parameter 12	0,04	-0,08	-0,12	0,20	0,09	0,06	0,13		0,03	0,06	0,05	0,09	1,00
Параметр 1/Parameter 1	Нормозооспермия/Normozoospermia												
Параметр 2/Parameter 2	Олигоастенотератозооспермия/Oligoasthenoteratozoospermia												
Параметр 3/Parameter 3	Астенозооспермия/Asthenozoospermia												
Параметр 4/Parameter 4	Олигостенозооспермия/Oligoasthenozoospermia												
Параметр 5/Parameter 5	Дискинезия/Dyskinesia												
Параметр 6/Parameter 6	Вискозипатия/Viscosipathia												
Параметр 7/Parameter 7	Лейкоспермия (Пиоспермия)/Leucospermia												
Параметр 8/Parameter 8	Гемоспермия/Hemospermia												
Параметр 9/Parameter 9	Олигоспермия/Oligospermia												
Параметр 10/Parameter 10	Агглютинация/Agglutination												
Параметр 11/Parameter 11	Некрозозооспермия/Necrozoospermia												
Параметр 12/Parameter 12	Индекс ФДНКС/ DFI												

Таблица 3 / Table 3

Корреляционная матрица исследуемых параметров спермограммы и уровнем *DFI* от >15 до <25 %, *n* = 105, коэффициент корреляции Пирсона *r* /
Correlation matrix of the studied parameters of basic semen examination and *DFI* from >15 to <25 %, *n* = 105, Pearson's rank correlation coefficient *r*

<i>r</i>	Возраст мужчины/ Male age	Параметр 1/ Parameter 1	Параметр 2/ Parameter 2	Параметр 3/ Parameter 3	Параметр 4/ Parameter 4	Параметр 5/ Parameter 5	Параметр 6/ Parameter 6	Параметр 7/ Parameter 7	Параметр 8/ Parameter 8	Параметр 9/ Parameter 9	Параметр 10/ Parameter 10	Параметр 11/ Parameter 11	Параметр 12/ Parameter 12
Возраст мужчины/ Male age	1,00	-0,18	0,20	0,18	-0,24	0,05	0,15	-0,25	-0,19	0,03	0,04	-0,09	0,17
Параметр 1/ Parameter 1	-0,18	1,00	-0,18	-0,55	-0,13	-0,39	-0,22	-0,15	-0,11	-0,08	-0,27	-0,37	0,09
Параметр 2/ Parameter 2	0,20	-0,18	1,00	-0,39	-0,09	0,30	0,16	0,31	-0,08	-0,06	-0,07	-0,10	0,24
Параметр 3/ Parameter 3	0,18	-0,55	-0,39	1,00	-0,29	0,03	0,19	-0,25	-0,25	0,14	0,34	0,08	-0,22
Параметр 4/ Parameter 4	-0,24	-0,13	-0,09	-0,29	1,00	0,23	-0,11	0,29	-0,06	-0,04	-0,17	0,24	0,07
Параметр 5/ Parameter 5	0,05	-0,39	0,30	0,03	0,23	1,00	0,50	0,31	-0,18	0,21	0,54	0,51	0,06
Параметр 6/ Parameter 6	-0,25	-0,15	0,31	-0,25	0,29	0,31	0,10	1,00	0,13	0,23	0,08	0,24	0,08
Параметр 7/ Parameter 7	-0,25	-0,15	0,31	-0,25	0,29	0,31	0,10	1,00	0,13	0,23	0,08	0,24	0,08
Параметр 8/ Parameter 8	-0,19	-0,11	-0,08	-0,25	-0,06	-0,18	-0,10	0,13	1,00	-0,04	-0,15	0,19	-0,07
Параметр 9/ Parameter 9	0,03	-0,08	-0,06	0,14	-0,04	0,21	0,15	0,23	-0,04	1,00	0,24	0,05	0,23
Параметр 10/ Parameter 10	0,04	-0,27	-0,07	0,34	-0,17	0,54	0,29	0,08	-0,15	0,24	1,00	0,64	-0,05
Параметр 11/ Parameter 11	-0,09	-0,37	-0,10	0,08	0,24	0,51	0,17	0,24	0,19	0,05	0,64	1,00	0,00
Параметр 12/ Parameter 12	0,17	0,09	0,24	-0,22	0,07	0,06	-0,07	0,08	-0,07	0,23	-0,05	0,01	1,00
Параметр 1/Parameter 1	Нормозооспермия/Normozoospermia												
Параметр 2/Parameter 2	Олигоастенотератозооспермия/Oligoasthenoteratozoospermia												
Параметр 3/Parameter 3	Астенозооспермия/Asthenozoospermia												
Параметр 4/Parameter 4	Олигостенозооспермия/Oligoasthenozoospermia												
Параметр 5/Parameter 5	Дискинезия/Dyskinesia												
Параметр 6/Parameter 6	Вискозипатия/Viscosipathia												
Параметр 7/Parameter 7	Лейкоспермия (Пиоспермия)/Leucospermia												
Параметр 8/Parameter 8	Гемоспермия/Hemospermia												
Параметр 9/Parameter 9	Олигоспермия/Oligospermia												
Параметр 10/Parameter 10	Агглютинация/Agglutination												
Параметр 11/Parameter 11	Некрозооспермия/Necrozoospermia												
Параметр 12/Parameter 12	Индекс ФДНКС/ <i>DFI</i>												

Таблица 4 / Table 4

**Корреляционная матрица исследуемых параметров спермограммы
и уровнем $DFI > 25\%$, $n = 121$, коэффициент корреляции Пирсона r /**

Correlation matrix of the studied parameters of basic semen examination and $DFI > 25\%$, $n = 121$,
Pearson's rank correlation coefficient r

r	Возраст мужчины/ Male age	Параметр 1/ Parameter 1	Параметр 2/ Parameter 2	Параметр 3/ Parameter 3	Параметр 4/ Parameter 4	Параметр 5/ Parameter 5	Параметр 6/ Parameter 6	Параметр 7/ Parameter 7	Параметр 8/ Parameter 8	Параметр 9/ Parameter 9	Параметр 10/ Parameter 10	Параметр 11/ Parameter 11	Параметр 12/ Parameter 12
Возраст мужчины/ Male age	1,00	-0,16	-0,05	0,28	-0,10	-0,23	-0,07	-0,23	0,09	-0,17	-0,17	-0,21	0,28
Параметр 1/ Parameter 1	-0,16	1,00	-0,17	-0,24	-0,07	-0,27	-0,16	-0,18	-0,07	-0,08	-0,19	-0,20	-0,14
Параметр 2/ Parameter 2	-0,05	-0,17	1,00	-0,67	-0,19	0,42	0,46	0,51	0,31	-0,03	0,14	0,13	0,07
Параметр 3/ Parameter 3	0,28	-0,24	-0,67	1,00	-0,28	-0,28	-0,17	-0,28	-0,23	0,16	0,03	-0,14	0,05
Параметр 4/ Parameter 4	-0,10	-0,07	-0,19	-0,28	1,00	-0,03	-0,18	-0,06	-0,09	-0,10	-0,23	0,06	0,01
Параметр 5/ Parameter 5	-0,23	-0,27	0,42	-0,28	-0,03	1,00	0,54	0,51	-0,06	0,12	0,45	0,39	-0,15
Параметр 6/ Parameter 6	-0,07	-0,16	0,46	-0,17	-0,18	0,54	1,00	0,44	0,10	-0,08	0,26	0,03	-0,02
Параметр 7/ Parameter 7	-0,23	-0,18	0,51	-0,28	-0,06	0,51	0,44	1,00	0,34	0,33	0,52	0,42	-0,01
Параметр 8/ Parameter 8	0,09	-0,07	0,31	-0,23	-0,09	-0,06	0,10	0,34	1,00	0,23	0,24	0,31	0,17
Параметр 9/ Parameter 9	-0,17	-0,08	-0,03	0,16	-0,10	0,12	-0,08	0,33	0,23	1,00	0,43	0,29	-0,08
Параметр 10/ Parameter 10	-0,17	-0,19	0,14	0,03	-0,23	0,45	0,26	0,52	0,24	0,43	1,00	0,70	-0,02
Параметр 11/ Parameter 11	-0,21	-0,20	0,13	-0,14	0,06	0,39	0,03	0,42	0,31	0,29	0,70	1,00	0,00
Параметр 12/ Parameter 12	0,28	-0,14	0,07	0,05	0,01	-0,15	-0,02	-0,01	0,17	-0,08	-0,02	0,00	1,00
Параметр 1/Parameter 1	Нормозооспермия/Normozoospermia												
Параметр 2/Parameter 2	Олигоастенотератозооспермия/Oligoasthenoteratozoospermia												
Параметр 3/Parameter 3	Астенозооспермия/Asthenozoospermia												
Параметр 4/Parameter 4	Олигостенозооспермия/Oligoasthenozoospermia												
Параметр 5/Parameter 5	Дискинезия/Dyskinesia												
Параметр 6/Parameter 6	Вискозипатия/Viscosipathia												
Параметр 7/Parameter 7	Лейкоспермия (Пиоспермия)/Leucospermia												
Параметр 8/Parameter 8	Гемоспермия/Hemospermia												
Параметр 9/Parameter 9	Олигоспермия/Oligospermia												
Параметр 10/Parameter 10	Агглютинация/Agglutination												
Параметр 11/Parameter 11	Некрозооспермия/Necrozoospermia												
Параметр 12/Parameter 12	Индекс ФДНКС/ DFI												

Таблица 5 / Table 5

**Корреляция между возрастом мужчины и индексом ФДНКС, $n = 492$ /
Male Age & DFI correlation, $n = 492$**

Коэффициент Пирсона/ Pearson's rank correlation coefficient	Взаимосвязь возраста и индекса ФДНКС/ Male Age & DFI correlation
Коэффициент корреляции Пирсона r / Pearson's rank correlation coefficient	0,1563
95 % конфиденциальный интервал/95 % confidence interval	от 0,06881 до 0,24130
P значение/ P value	0,0005
Значимость альфа = 0,05/Significant (alpha = 0.05)	Да

Установлена слабая прямая корреляция между индексом ФДНКС и олиастенотератозооспермией ($r = 0,19$; $p < 0,0001$), пиоспермией ($r = 0,29$; $p < 0,0001$); некрозооспермией ($r = 0,16$; $p = 0,0004$) (табл. 6).

Таблица 6 / Table 6

**Корреляционная матрица исследуемых параметров спермограммы и уровнем ФДНКС, $n = 492$,
коэффициент корреляции Пирсона r /**

Correlation matrix of the studied parameters of basic semen examination and DFI, $n = 492$,
Pearson's rank correlation coefficient r

r	Параметр 1/ Parameter 1	Параметр 2/ Parameter 2	Параметр 3/ Parameter 3	Параметр 4/ Parameter 4	Параметр 5/ Parameter 5	Параметр 6/ Parameter 6	Параметр 7/ Parameter 7	Параметр 8/ Parameter 8	Параметр 9/ Parameter 9	Параметр 10/ Parameter 10	Параметр 11/ Parameter 11	Параметр 12/ Parameter 12
Параметр 1/ Parameter 1	1,00	-0,17	-0,48	-0,12	-0,34	-0,21	-0,14	-0,08	-0,09	-0,18	-0,28	-0,10
Параметр 2/ Parameter 2	-0,17	1,00	-0,45	-0,11	0,36	0,24	0,45	0,18	0,04	0,05	0,01	0,19
Параметр 3/ Parameter 3	-0,48	-0,45	1,00	-0,30	-0,02	0,13	-0,21	-0,19	0,09	0,24	0,12	-0,03
Параметр 4/ Parameter 4	-0,12	-0,11	-0,30	1,00	0,10	-0,13	0,02	-0,05	-0,05	-0,21	0,09	-0,01
Параметр 5/ Parameter 5	-0,34	0,36	-0,02	0,10	1,00	0,49	0,33	-0,06	0,17	0,44	0,44	0,15
Параметр 6/ Parameter 6	-0,21	0,24	0,13	-0,13	0,49	1,00	0,26	0,03	0,12	0,27	0,13	0,17
Параметр 7/ Parameter 7	-0,14	0,45	-0,21	0,02	0,33	0,26	1,00	0,35	0,32	0,23	0,29	0,29
Параметр 8/ Parameter 8	-0,08	0,18	-0,19	-0,05	-0,06	0,03	0,35	1,00	0,19	0,04	0,20	0,09
Параметр 9/ Parameter 9	-0,09	0,04	0,09	-0,05	0,17	0,12	0,32	0,19	1,00	0,26	0,12	0,05
Параметр 10/ Parameter 10	-0,18	0,05	0,24	-0,21	0,44	0,27	0,23	0,04	0,26	1,00	0,59	0,09
Параметр 11/ Parameter 11	-0,28	0,01	0,12	0,09	0,44	0,13	0,29	0,20	0,12	0,59	1,00	0,16
Параметр 12/ Parameter 12	-0,10	0,19	-0,03	-0,01	0,15	0,17	0,29	0,09	0,05	0,09	0,16	1,00

Обсуждение

Помимо спермограммы во всем мире наблюдается тенденция к расширенному исследованию эякулята, используя дополнительные тесты на ФДНКС. Согласно научному мнению, существует признание того, что ФДНКС может быть клинически информативным как для результатов ВРТ, так и при прегравидарной подготовке к естественному зачатию [17, 25, 26]. Вопреки этому, некоторые профессиональные общества, такие как Американское общество репродуктивной медицины (American Society for Reproductive Medicine/ASRM), Американская урологическая ассоциация (American Urological Association/AUA), Европейская ассоциация урологов (European Association of Urology/EAU), не настаивают на обязательном тестировании на ФДНКС при скрининговом обследовании на бесплодие [27 – 29]. Возможные причины связаны с технологическими неудачами, касающимися отличительных характеристик анализов и неоднородности популяции пациентов, что привело к неоднозначным выводам относительно клинической информативности результатов ФДНКС [30, 31].

В частности, Комитет по практике ASRM подчеркивает, что существующие данные, касающиеся связи между ФДНКС и репродуктивными результатами, слишком ограничены, чтобы регулярно рекомендовать использование исследования на ФДНКС для партнера мужского пола в бесплодной паре. К тому же добавляется, что «...поскольку прогностическая клиническая значимость оценки целостности ДНК может не повлиять на лечение супружеских пар, рутинное использование тестов на ФДНКС при установлении мужского фактора бесплодия является спорным».

С другой стороны, внимание привлекает противоречивость данных ASRM, так как в 2015 году руководство этой организации уже признало, что 1) «Лечение варикоцеле и использование антиоксидантов могут повлиять на целостность ДНК сперматозоидов»; 2) «сперматозоиды, извлеченные из яичек, как правило, имеют лучшее качество ДНК, чем сперматозоиды, полученные путем эякуляции»; а в примечании с предостережением указано: «не доказано, что лечение аномальной целостности ДНК имеет клиническую ценность» [29].

С каждым годом появляется все больше новых научных данных, которые указывают на тесную взаимосвязь между ФДНКС и варикоцеле, идеопатическим бесплодием, исходами ВРТ, факторами окружающей среды и образом жизни, так же, как и новые данные о потенциальной поль-

зе клинических и хирургических вмешательств как средств снижения ФДНКС [19, 32].

Два недавних руководства по клинической практике (clinical practice guidelines/CPG) содержат конкретные рекомендации относительно тестирования на ФДНКС. В руководстве по повторным потерям беременности (CPG RPL/recurrent pregnancy loss), выпущенном Европейским обществом репродукции человека и эмбриологии (European Society for Human Reproduction and Embryology/ESHRE), указано: «оценка ФДНКС у пар с RPL, определяемой двумя или более потерями беременности с момента зачатия до 24 недель беременности, может быть рассмотрена в пояснительных целях на основе косвенных доказательств» [33].

Систематический обзор и метаанализ тринадцати проспективных исследований 2019 года, в которых приняли участие основная группа из 579 мужчин, партнеры-женщины которых были с RPL, и контрольная группа из 434 мужчин, у которых были фертильные партнеры-женщины, показали, что уровни *DFI* были значительно выше в первом случае (среднее различие 11,9 %, 95 % ДИ 4,9 – 18,8 %) [7].

Общество трансляционной медицины (Society for Translational Medicine/STM) также предоставило научно обоснованное руководство по рекомендации тестирования на ФДНКС. Это руководство отражает актуальные фактические данные и обеспечивает основу стандартизированного лечения, основанного на клинических сценариях. Так, руководство SMT рекомендует исследование на ФДНКС для пар с идиопатическим бесплодием и тех, у кого RPL, определяемые как две или более с момента зачатия до 24 недель. Пациенты мужского пола с такими факторами риска, как ОС, включая условия образа жизни (курение, ожирение, метаболический синдром и др.), варикоцеле, урогенитальные инфекции, пожилой возраст и токсическое воздействие (окружающая среда, наркотики, облучение, химиотерапия), также должны пройти обследование. Упомянутое выше руководство рекомендует тестирование на ФДНКС после неудачного цикла ВМИ (внутриматочной инсеминации), ЭКО (экстракорпорального оплодотворения) или ИКСИ (интрацитоплазматической инъекции сперматозоида) при условии, что не существует других очевидных причин, объясняющих эту проблему [5].

Руководства ESHRE и STM были первой совместной попыткой объединить существующие

данные и предоставить клиницистам основанные на доказательных данных рекомендации по вмешательствам. Документы были рассмотрены многими экспертами по всему миру, чьи авторитетные комментарии о их клинической полезности можно найти в научной литературе [34 – 36].

В клинических рекомендациях (КР) «Вспомогательные репродуктивные технологии и искусственная инсеминация (протокол лечения) (2019) Российской Ассоциации Репродукции Человека (РАРЧ) до сих пор не упоминается тест на ФДНКС (на момент публикации статьи отсутствует информация о КР РАРЧ на сайте Министерства Здравоохранения Российской Федерации (МЗ РФ) в разделе «Рубрикатор КР»). С другой стороны, при различных сценариях патоспермии, минуя тесты ФДНКС, КР РАРЧ сразу рекомендуют дорогостоящее предимплантационное генетическое тестирование (ПГТ), представленное группой обязательных исследований, направленных на определение количественных хромосомных нарушений (синдромов Дауна, Патау и др.) (ПГТ-А/PGT-A), диагностику моногенных заболеваний (муковисцероз, талассемия, болезнь Тея-Сакса и др.) (ПГТ-М/PGT-M), структурных хромосомных перестроек (тяжелые врожденные пороки) (ПГТ-СП/PGT-SR) [37].

Напротив, Общероссийская общественная организация «Российское общество урологов» (РОУ) в недавних КР «Мужское бесплодие» (2021) [41] рекомендует проводить дополнительную оценку функциональных характеристик сперматозоидов, а также целостности и состоятельности их генетического материала при идиопатическом мужском бесплодии на основании различных тестов, в том числе определение фрагментации ДНК сперматозоидов, ссылаясь на вышеупомянутые рекомендации Комитета по практике ASRM [29].

Более того, за последние годы увеличилось количество фактических данных, которые указывают на неблагоприятное влияние ФДНКС на результаты ВРТ [8, 39]. Различные дизайны исследования изучали взаимосвязь между ФДНКС и фертильностью, включая самостоятельную беременность, идиопатическое бесплодие, привычное невынашивание беременности, ВМИ, ЭКО и ИКСИ. Несколько исследований на клинических данных подтвердили негативное влияние повреждения ДНК сперматозоидов на результаты ВРТ, в то время как результаты обычных параметров эякулята не выявили каких-либо нарушений [8, 40].

Так, в исследовании на ИКСИ с использованием донорских ооцитов с доказанной фертильностью

показано, что уровень *DFI* у супружеских пар с неудачными попытками зачатия был выше чем у пар с наступившей беременностью – *DFI* 34,9 % и *DFI* 25,3 % соответственно ($p < 0,001$) [41]. Авторы работы отметили, что результативность Гало-теста/SCD, используемого в клиническом наблюдении, имеет чувствительность 75 % и специфичность 69 %, что может быть информативным для прогнозирования беременности.

Другое исследование было выполнено также с Гало-тестом/SCD в сперме у 161 мужчины в протоколе ЭКО. Анализ спермы и результаты повреждения ДНК сперматозоидов сравнивались между парами, которые забеременели или не забеременели. Уровень ФДНКС различался между двумя группами ($p < 0,05$), также была установлена отрицательная корреляция с результатами ЭКО. Логистический регрессионный анализ подтвердил, что уровень ФДНКС является независимым предиктором достижения клинической беременности. Также было проведено сравнение влияния различных уровней ФДНКС на результаты ЭКО, где была отмечена разница в *DFI* и качестве 3-дневных эмбрионов, скорости образования blastocyst, а также в частоте имплантации и наступления беременности ($p < 0,05$). Авторы работы подчеркивают, что повреждение ДНК сперматозоидов, установленное Гало-тестом/SCD, представляется важным для прогнозирования частоты наступления беременности после ЭКО [8].

В научных исследованиях на рубеже XX – XXI века уже было отмечено, что олигоастератозооспермия коррелирует с высоким уровнем ФДНКС [8, 42 – 44]. Более того, было показано, что мужчины с нормальными параметрами эякулята имеют различные уровни ФДНКС [45, 46]. В 25 – 30 % случаев, диагностированных как мужское идиопатическое бесплодие, обнаруживается высокий процент сперматозоидов с фрагментацией ДНК [5].

В многочисленных публикациях особое внимание уделяется одному из основных параметров базовой оценки спермы – пероксидазо-положительным клеткам (ППК), концентрация которых $> 1 \times 10^6$ /мл эякулята определяется как лейкоцитоспермия (пиоспермия) [11]. Исследования утверждают, что ППК являются пусковым фактором для образования АФК (активных форм кислорода) в сперматозоидах, что приводит к повреждению ДНК и снижению качества спермы. Стоит подчеркнуть, что пиоспермия была обнаружена примерно у 10 – 20 % бесплодных мужчин [47, 48].

Результаты настоящего одномоментного исследования подтверждают и дополняют концепцию мировых публикаций. Так, в настоящей работе показано, что отсутствие ФДНКС было выявлено у 54,1 % мужчин с бесплодием, которые были в возрасте 37 лет (средний возраст), в параметрах спермограммы которых можно чаще всего увидеть астенозооспермию и вискозипатию; также можно предположить, что картина олигоастенозооспермии у этой категории добровольцев встречается редко, но с высокой долей вероятности можно отрицать у них наличие пиоспермии.

В работе установлен сомнительный уровень ФДНКС у 21,3 % бесплодных мужчин, которые были в возрасте 39 лет (средний возраст), в параметрах спермограммы которых можно чаще всего увидеть олигоастенозооспермию, олигоспермию, также можно предположить, что картина астенозооспермии у этой категории добровольцев встречается редко.

Важно отметить, что у четверти (24,6 %) бесплодных мужчин, которые в основном были в возрасте после 40 лет, можно предположить высокий уровень индекса ФДНКС.

Что касается всей обследуемой выборки ($n = 492$), настоящее исследование подчеркивает, что чем старше возраст мужчины, тем выше может быть индекс ФДНКС, тем чаще можно наблюдать картину олигоастенозооспермии, пиоспермии и некрозооспермии в параметрах спермограммы у таких мужчин. Наше исследование может подтверждать гипотезу о том, что в 25 – 30 % случаев, диагностированных как мужское идиопатическое бесплодие, обнаруживается высокий процент сперматозоидов с фрагментацией ДНК [5]; а также гипотезу о том, что у 10 – 20 % бесплодных мужчин выявляется пиоспермия, которая является пусковым фактором для образования АФК в сперматозоидах, что приводит к повреждению ДНК и снижению качества спермы [47, 48].

Заключение

Отсутствие ФДНКС было установлено у 54,1 % ($266/492 = 54,1$ %) мужчин, средний возраст которых составил 36,58 года ($DFI \leq 15$ %); отмечена слабая прямая корреляция между нормальным уровнем ФДНКС и астенозооспермией ($r = 0,20$; $p < 0,0001$) и вискозипатией ($r = 0,13$; $p < 0,0001$); слабая обратная корреляция с олигоастенозооспермией ($r = -0,12$; $p < 0,0001$); отмечено отсутствие пиоспермии. Сомнительный результат по наличию ФДНКС установлен у 21,3 % ($105/492 = 21,3$ %) мужчин, средний возраст кото-

рых составил 38,71 года (DFI в диапазоне от >15 до <25 %); отмечена слабая прямая корреляция между сомнительным уровнем ФДНКС и олигоастенозооспермией ($r = 0,24$; $p < 0,0001$), олигоспермией ($r = 0,23$; $p < 0,0001$) и средним возрастом 39 лет ($r = 0,17$; $p < 0,0001$); слабая обратная зависимость с астенозооспермией ($r = -0,22$; $p < 0,0001$). ФДНКС была обнаружена у 24,6 % ($121/492 = 24,6$ %) мужчин, средний возраст которых составил 41,55 года ($DFI > 25$ %); отмечена слабая прямая корреляция между высоким уровнем ФДНКС и средним возрастом 44 года ($r = 0,28$; $p < 0,0001$).

Во всей обследуемой выборке бесплодных мужчин ($n = 492$) установлена слабая прямая корреляция между уровнем ФДНКС и возрастом ($r = 0,1563$; $p = 0,0005$), олигоастенозооспермией ($r = 0,19$; $p < 0,0001$), пиоспермией ($r = 0,29$; $p < 0,0001$) и некрозооспермией ($r = 0,16$; $p = 0,0004$).

Результаты настоящего исследования показали, что набор ГЕМСТАНДАРТ–ГалоСперм Л&К дополняет рутинную спермограмму, предоставляя конкретную информацию клиницисту о качестве генетического материала эякулята. Валидированный протокол выполнения теста будет способствовать стандартизации технологии выявления теста на дисперсию ДНК-фрагментов сперматозоидов в российских клиничко-диагностических лабораториях и в специализированных эмбриологических лабораториях в целях скрининга нарушений мужской репродуктивной функции. Результаты быстрого и точного Гало-теста могут быть полезны клиницистам для разработки новых лечебно-диагностических стратегий и тактик у мужчин с нарушением фертильности как для естественного процесса репродукции, так и для ВРТ.

Список литературы

1. Aitken R.J., Bronson R., Smith T.B., et al. The source and significance of DNA damage in human spermatozoa; a commentary on diagnostic strategies and straw man fallacies // *Mol Hum Reprod*. 2013. Vol. 19. P. 475-485.
2. Aitken R.J., De Iulii G.N. On the possible origins of DNA damage in human spermatozoa // *Mol Hum Reprod*. 2010. Vol. 16, N 3.
3. Agarwal A., Said T.M. Role of sperm chromatin abnormalities and DNA damage in male infertility // *Hum Reprod Update*. 2003. Vol. 9. P. 331-345.
4. Aitken R.J. Impact of Oxidative Stress on Male and Female Germ Cells: Implications for Fertility //

Reproduction. 2020. Vol. 159, N 4. P. 189-201. DOI: 10.1530/REP19-0452

5. Agarwal A., Parekh N., Panner Selvam M.K., et al. Male Oxidative Stress Infertility (MOSI): Proposed Terminology and Clinical Practice Guidelines for Management of Idiopathic Male Infertility // *World J. Mens Health*. 2019. Vol. 37, N 3. P. 296-312. DOI: 10.5534/wjmh.190055

6. Esteves S.C. Interventions to prevent sperm DNA damage effects on reproduction // *Advances in Experimental Medicine and Biology*. 2019. Vol. 1166. P. 119-148. DOI: 10.1007/978-3-030-21664-1_8

7. McQueen D.B., Zhang J., Robins J.C. Sperm DNA fragmentation and recurrent pregnancy loss: a systematic review and meta-analysis // *Fertil Steril*. 2019. Vol. 112. P. 54-60.

8. Zheng W.W., Song G., Wang Q.L., et al. Sperm DNA damage has a negative effect on early embryonic development following in vitro fertilization // *Asian J Androl*. 2018. Vol. 20. P. 75-79. Доступно по: <https://www.ajandrology.com/text.asp?2018/20/1/75/209295>. Ссылка активна на 28.08.2022.

9. Hamilton T.R.D.S., Assumpção M.E.O.D. Sperm DNA fragmentation: causes and identification // *Zygote*. 2020. Vol. 28, N 1. P. 1-8. DOI: 10.1017/S0967199419000595

10. Dutta S., Henkel R., Agarwal A. Comparative analysis of tests used to assess sperm chromatin integrity and DNA fragmentation. // *Andrologia*. 2021. Vol. 53, N 2. DOI: 10.1111/and.13718

11. Who laboratory manual for the examination and processing of human semen. Sixth Edition // *World Health Organization*. 2021.

12. Henkel R., Kierspel E., Hajimohammad M., et al. DNA fragmentation of spermatozoa and assisted reproduction technology // *Reprod Biomed Online*. 2003. Vol. 7. P. 477-484.

13. Seli E., Gardner D.K., Schoolcraft W.B., et al. Extent of nuclear DNA damage in ejaculated spermatozoa impacts on blastocyst development after in vitro fertilization // *Fertil Steril*. 2004. Vol. 82. P. 378-383.

14. Lin M.H., Kuo-Kuang L.R., Li S.H., et al. 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 // *Fertil Steril*. 2008. Vol. 90. P. 352-359.

15. Lewis S.E., Agbaje I., Alvarez J. Sperm DNA tests as useful adjuncts to semen analysis // *Syst Biol Reprod Med*. 2008. Vol. 54. P. 111-125.

16. Evenson D.P. Sperm Chromatin Structure Assay (SCSA): 30 years of experience with the SCSA // *Sperm Chromatin: Biological and Clinical Applications in Male Infertility and Assisted Reproduction*. 2011. P. 125-149. DOI: 10.1007/978-1-4419-6857-9_9

17. Robinson L., Gallos I.D., Conner S.J., et al. The effect of sperm DNA fragmentation on miscarriage rates: a systematic review and metaanalysis // *Hum Reprod*. 2012. Vol. 27. P. 2908-2917.

18. Muratori M., De Geyter C. Chromatin condensation, fragmentation of DNA and differences in the epigenetic signature of infertile men // *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab*. 2019. Vol. 33, N 1. P. 117-126. DOI: 10.1016/j.beem.2018.10.004

19. Esteves S.C., Santi D., Simoni M. An update on clinical and surgical interventions to reduce sperm DNA fragmentation in infertile men // *Andrology*. 2020. Vol. 8, N 1. P. 53-81. Доступно по: <https://doi.org/10.1111/andr.12724>.

20. Javed A., Talkad M.S., Ramaiah M.K. Evaluation of sperm DNA fragmentation using multiple methods: a comparison of their predictive power for male infertility // *Clin Exp Reprod Med*. 2019. Vol. 46. P. 14-21.

21. Sandro C.E., Carmen L.F., Mercedes G.M., et al. Reliability of the sperm chromatin dispersion assay to evaluate sperm deoxyribonucleic acid damage in men with infertility // *Fertility and Sterility*. 2022. Vol. 117, N 1. P. 64-73. DOI: 10.1016/j.fertnstert.2021.08.045

22. McEvoy A., Roberts P., Yap K. Development of a simplified method of human semen storage for the testing of sperm DNA fragmentation using the Halosperm G2 test kit // *Fertil Steril*. 2014. Vol. 102. P. 981-988.

23. Fernandez J.L., Muriel L., Goyanes V., et al. Simple determination of human sperm DNA fragmentation with an improved sperm chromatin dispersion test // *Fertil Steril*. 2005. Vol. 84. P. 833-842.

24. Fernandez J.L., Cajigal D., Lopez-Fernandez C., et al. Assessing sperm DNA fragmentation with the sperm chromatin dispersion test // *Methods Mol Biol*. 2011. Vol. 682. P. 291-301.

25. Simon L., Proutski I. Sperm DNA damage has negative association with live birth rates after IVF // *Reprod. Biomed*. 2013.

26. Sheena E.M. The impact of sperm DNA damage in assisted conception and beyond: recent advances in diagnosis and treatment // *Reproductive BioMedicine Online*. 2013.

27. Jungwirth A., Giwercman A., Tournaye H., et al. European Association of Urology Working Group on Male Infertility // *European Association of Urology guidelines on Male Infertility*. 2012. Vol. 62. P. 324-332.

28. Practice Committee of the American Society for Reproductive Medicine. The clinical utility of sperm DNA integrity testing: a guideline // *Fertil Steril*. 2013. Vol. 99. P. 673-677.

29. Practice Committee of the American Society for Reproductive Medicine. Diagnostic evaluation of the infertile male: a committee opinion // *Fertil Steril*. 2015. Vol. 103. P. 18-25.

30. Bach P.V., Schlegel P.N. Sperm DNA damage and its role in IVF and ICSI // *Basic and Clinical Andrology*. 2016. Vol. 26. P. 15.

31. Esteves S.C., Agarwal A., Cho C.L., et al. A Strengths-Weaknesses-Opportunities – Threats (SWOT) analysis on the clinical utility of sperm DNA fragmentation testing in specific male infertility scenarios // *Transl Androl Urol*. 2017. Vol. 6, N 4. P. 734-760.

32. Боровец С.Ю., Егорова В.А., Гэгзян А.М., Аль-Шукри С.Х. Фрагментация ДНК сперматозоидов: клиническая значимость, причины, методы оценки и коррекции // Урологические ведомости 2020. Т. 10, № 2. С. 173-180. Доступно по: <https://doi.org/10.17816/uroved102173-180>.
33. Aitken R.J. DNA damage in human spermatozoa; important contributor to mutagenesis in the offspring // *Transl Androl Urol*. 2017. Vol. 6, N 4. P. 761-764.
34. *Translational Andrology and Urology // Sperm DNA Fragmentation*. 2017. Vol. 6, N 4. Доступно по: <http://tau.amegroups.com/issue/view/612>.
35. Esteves S.C., Agarwal A., Majzoub A. The complex nature of the sperm DNA damage process // *Transl Androl Urol*. 2017. Vol. 6, N 4. P. 557-559.
36. Majzoub A., Agarwal A., Cho CL., et al. Sperm DNA fragmentation testing: across sectional survey on current practices of fertility specialists // *Transl Androl Urol*. 2017. Vol. 6, N 4. P. 710-719.
37. Вспомогательные репродуктивные технологии и искусственная инсеминация (протокол лечения) // Клинические рекомендации МЗ РФ 05 марта 2019 г. № 15-4/и/2-1908. Доступно по: https://rahr.ru/d_pech_mat_metod/BPT1.pdf.
38. Мужское бесплодие // Клинические рекомендации. 2021. Доступно по: https://cr.minzdrav.gov.ru/schema/5_2. Ссылка активна на 28.08.2022.
39. Coughlan C., Clarke H., Cutting R., et al. Sperm DNA fragmentation, recurrent implantation failure and recurrent miscarriage // *Asian J Androl*. 2015. Vol. 17. P. 681-685.
40. Simon L., Zini A., Dyachenko A., et al. A systematic review and meta-analysis to determine the effect of sperm DNA damage on in vitro fertilization and intracytoplasmic sperm injection outcome // *Asian J Androl*. 2017. Vol. 19. P. 80-90.
41. Gosálvez J., Caballer P., López-Fernández C., et al. Can DNA fragmentation of neat or swim-up spermatozoa be used to predict pregnancy following ICSI of fertile oocyte donors? // *Asian Journal of Andrology*. 2013. Vol. 15. P. 812-818. DOI: 10.1038/aja.2013.74
42. Lopes S., Sun J.G., Jurisicova A., et al. Sperm deoxyribonucleic acid fragmentation is increased in poor-quality semen samples and correlates with failed fertilization in intracytoplasmic sperm injection // *Fertil Steril*. 1998. Vol. 69. P. 528-532.
43. 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 in vitro fertilization and intracytoplasmic sperm injection cycles // *Fertil Steril*. 2004. Vol. 81. P. 1289-1295.
44. Borini A., Tarozzi N., Bizzaro D., et al. Sperm DNA fragmentation: paternal effect on early postimplantation embryo development in ART // *Hum Reprod*. 2006. Vol. 21. P. 2876-2881.
45. Simon L., Castillo J., Oliva R., et al. Relationships between human sperm protamines, DNA damage and assisted reproduction outcomes // *Reprod Biomed Online*. 2011. Vol. 23. P. 724-734.
46. Simon L., Lutton D., McManus J., et al. Sperm DNA damage measured by the alkaline Comet assay as an independent predictor of male infertility and in vitro fertilization success // *Fertil Steril*. 2011. Vol. 95. P. 652-657.
47. Saleh R.A., Agarwal A., Kandirali E., et al. Leukocytospermia Is Associated with Increased Reactive Oxygen Species Production by Human Spermatozoa // *Fertil. Sterility*. 2002. Vol. 78, N 6. P. 1215-1224. DOI: 10.1016/s0015-0282(02)04237-1
48. Agarwal A., Mulgund A., Alshahrani S., et al. Reactive Oxygen Species and Sperm DNA Damage in Infertile Men Presenting with Low Level Leukocytospermia // *Reprod. Biol. Endocrinol*. 2014. Vol. 12, N 126. DOI: 10.1186/1477-7827-12-126

References

- Aitken RJ, Bronson R, Smith TB, et al. The source and significance of DNA damage in human spermatozoa; a commentary on diagnostic strategies and straw man fallacies. *Mol Hum Reprod*. 2013;19:475-85.
- Aitken RJ, De Iuliis GN. On the possible origins of DNA damage in human spermatozoa. *Mol Hum Reprod*. 2010;16(3).
- Agarwal A, Said TM. Role of sperm chromatin abnormalities and DNA damage in male infertility. *Hum Reprod Update*. 2003;9:331-45.
- Aitken RJ. Impact of Oxidative Stress on Male and Female Germ Cells: Implications for Fertility. *Reproduction*. 2020;159(4):189-201. DOI: 10.1530/REP19-0452
- Agarwal A, Parekh N, Panner Selvam MK, et al. Male Oxidative Stress Infertility (MOSI): Proposed Terminology and Clinical Practice Guidelines for Management of Idiopathic Male Infertility. *World J. Mens Health*. 2019;37(3):296-312. DOI: 10.5534/wjmh.190055
- Esteves SC. Interventions to prevent sperm DNA damage effects on reproduction. *Advances in Experimental Medicine and Biology*. 2019;1166:119-48. DOI: 10.1007/978-3-030-21664-1_8
- McQueen DB, Zhang J, Robins JC. Sperm DNA fragmentation and recurrent pregnancy loss: a systematic review and meta-analysis. *Fertil Steril*. 2019;112:54-60.
- Zheng WW, Song G, Wang QL, et al. Sperm DNA damage has a negative effect on early embryonic development following in vitro fertilization. *Asian J Androl*. 2018;20:75-9. Available at: <https://www.ajandrology.com/text.asp?2018/20/1/75/209295>. Accessed: 28.08.2022.
- Hamilton TRDS, Assumpção MEOD. Sperm DNA fragmentation: causes and identification. *Zygote* 2020;28(1):1-8. DOI: 10.1017/S0967199419000595
- Dutta S, Henkel R, Agarwal A. Comparative analysis of tests used to assess sperm chromatin integrity and DNA fragmentation. *Andrologia*. 2021;53(2). DOI: 10.1111/and.13718
- Who laboratory manual for the examination and processing of human semen. Sixth Edition. *World Health Organization*. 2021.

12. Henkel R, Kierspel E, Hajimohammad M, et al. DNA fragmentation of spermatozoa and assisted reproduction technology. *Reprod Biomed Online*. 2003;7:477-84.
13. Seli E, Gardner DK, Schoolcraft WB, et al. Extent of nuclear DNA damage in ejaculated spermatozoa impacts on blastocyst development after in vitro fertilization. *Fertil Steril*. 2004;82:378-83.
14. Lin MH, Kuo-Kuang LR, Li SH, et al. 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. *Fertil Steril*. 2008;90:352-9.
15. Lewis SE, Agbaje I, Alvarez J. Sperm DNA tests as useful adjuncts to semen analysis. *Syst Biol Reprod Med*. 2008;54:111-25.
16. Evenson DP. Sperm Chromatin Structure Assay (SCSA): 30 years of experience with the SCSA. *Sperm Chromatin: Biological and Clinical Applications in Male Infertility and Assisted Reproduction*. 2011;125-49. DOI: 10.1007/978-1-4419-6857-9_9
17. Robinson L, Gallos ID, Conner SJ, et al. The effect of sperm DNA fragmentation on miscarriage rates: a systematic review and metaanalysis. *Hum Reprod*. 2012; 27:2908-17.
18. Muratori M, De Geyter C. Chromatin condensation, fragmentation of DNA and differences in the epigenetic signature of infertile men. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab*. 2019;33(1):117-26. DOI: 10.1016/j.beem.2018.10.004
19. Esteves SC, Santi D, Simoni M. An update on clinical and surgical interventions to reduce sperm DNA fragmentation in infertile men. *Andrology*. 2020;8(1):53-81. Available at: <https://doi.org/10.1111/andr.12724>.
20. Javed A, Talkad MS, Ramaiah MK. Evaluation of sperm DNA fragmentation using multiple methods: a comparison of their predictive power for male infertility. *Clin Exp Reprod Med*. 2019;46:14-21.
21. Sandro CE, Carmen LF, Mercedes GM, et al. Reliability of the sperm chromatin dispersion assay to evaluate sperm deoxyribonucleic acid damage in men with infertility. *Fertility and Sterility*. 2022;117(1):64-73. DOI: 10.1016/j.fertnstert.2021.08.045
22. McEvoy A, Roberts P, Yap K. Development of a simplified method of human semen storage for the testing of sperm DNA fragmentation using the Halosperm G2 test kit. *Fertil Steril*. 2014;102:981-8.
23. Fernandez JL, Muriel L, Goyanes V, et al. Simple determination of human sperm DNA fragmentation with an improved sperm chromatin dispersion test. *Fertil Steril*. 2005;84:833-42.
24. Fernandez JL, Cajigal D, Lopez-Fernandez C, et al. Assessing sperm DNA fragmentation with the sperm chromatin dispersion test. *Methods Mol Biol*. 2011;682:291-301.
25. Simon L, Proutski I. Sperm DNA damage has negative association with live birth rates after IVF. *Reprod Biomed*. 2013.
26. Sheena EM. The impact of sperm DNA damage in assisted conception and beyond: recent advances in diagnosis and treatment. *Reproductive BioMedicine Online*. 2013.
27. Jungwirth A, Giwercman A, Tournaye H, et al. European Association of Urology Working Group on Male Infertility. *European Association of Urology guidelines on Male Infertility*. 2012;62:324-32.
28. Practice Committee of the American Society for Reproductive Medicine. The clinical utility of sperm DNA integrity testing: a guideline. *Fertil Steril*. 2013;99:673-7.
29. Practice Committee of the American Society for Reproductive Medicine. Diagnostic evaluation of the infertile male: a committee opinion. *Fertil Steril*. 2015; 103:18-25.
30. Bach PV, Schlegel PN. Sperm DNA damage and its role in IVF and ICSI. *Basic and Clinical Andrology*. 2016;26:15.
31. Esteves SC, Agarwal A, Cho CL, et al. A Strengths-Weaknesses-Opportunities – Threats (SWOT) analysis on the clinical utility of sperm DNA fragmentation testing in specific male infertility scenarios. *Transl Androl Urol*. 2017;6(4):734-60.
32. Borovets SYu, Egorova VA, Gzgzyan AM, et al. Sperm DNA fragmentation: clinical significance, causes, methods of evaluation and correction. *Urological statements*. 2020;10(2):173-80. (In Russ). Available at: <https://doi.org/10.17816/uroved102173-180>.
33. Aitken RJ. DNA damage in human spermatozoa; important contributor to mutagenesis in the offspring. *Transl Androl Urol*. 2017;6(4):761-4.
34. Translational Andrology and Urology. *Sperm DNA Fragmentation*. 2017;6(4). Available at: <http://tau.amegroups.com/issue/view/612>.
35. Esteves SC, Agarwal A, Majzoub A. The complex nature of the sperm DNA damage process. *Transl Androl Urol*. 2017;6(4):557-9.
36. Majzoub A, Agarwal A, Cho CL, et al. Sperm DNA fragmentation testing: across sectional survey on current practices of fertility specialists. *Transl Androl Urol*. 2017;6(4):710-9.
37. Assisted reproductive technologies and artificial insemination (treatment protocol). *Clinical recommendations of the Ministry of Health of the Russian Federation*. March 05, 2019. N 15-4/i/2-1908. Available at: https://rahr.ru/d_pec_h_mat_metod/BPT1.pdf.
38. Male infertility. *Clinical guidelines*. 2021. Available at: https://cr.minzdrav.gov.ru/schema/5_2. Accessed: 28.08.2022.
39. Coughlan C, Clarke H, Cutting R, et al. Sperm DNA fragmentation, recurrent implantation failure and recurrent miscarriage. *Asian J Androl*. 2015;17:681-5.
40. Simon L, Zini A, Dyachenko A, et al. A systematic review and meta-analysis to determine the effect of sperm DNA damage on in vitro fertilization and intracytoplasmic sperm injection outcome. *Asian J Androl*. 2017;19: 80-90.
41. Gosálvez J, Caballer P, López-Fernández C, et al. Can DNA fragmentation of neat or swim-up spermatozoa be used to predict pregnancy following ICSI of fertile oocyte donors? *Asian Journal of Andrology*. 2013;15: 812-8. DOI: 10.1038/aja.2013.74

42. Lopes S, Sun JG, Jurisicova A, et al. Sperm deoxyribonucleic acid fragmentation is increased in poor-quality semen samples and correlates with failed fertilization in intracytoplasmic sperm injection. *Fertil Steril.* 1998;69: 528-32.
43. Virro MR, Larson-Cook KL, Evenson DP. Sperm chromatin structure assay (SCSA) parameters are related to fertilization, blastocyst development, and ongoing pregnancy in in vitro fertilization and intracytoplasmic sperm injection cycles. *Fertil Steril.* 2004;81:1289-95.
44. Borini A, Tarozzi N, Bizzaro D, et al. Sperm DNA fragmentation: paternal effect on early postimplantation embryo development in ART. *Hum Reprod.* 2006;21: 2876-81.
45. Simon L, Castillo J, Oliva R, et al. Relationships between human sperm protamines, DNA damage and assisted reproduction outcomes. *Reprod Biomed Online.* 2011;23:724-34.
46. Simon L, Lutton D, McManus J, et al. Sperm DNA damage measured by the alkaline Comet assay as an independent predictor of male infertility and in vitro fertilization success. *Fertil Steril.* 2011;95:652-7.
47. Saleh RA, Agarwal A, Kandirali E, et al. Leukocytospermia Is Associated with Increased Reactive Oxygen Species Production by Human Spermatozoa. *Fertil Sterility.* 2002;78(6):1215-24. DOI: 10.1016/s0015-0282(02)04237-1
48. Agarwal A, Mulgund A, Alshahrani S, et al. Reactive Oxygen Species and Sperm DNA Damage in Infertile Men Presenting with Low Level Leukocytospermia. *Reprod. Biol. Endocrinol.* 2014;12(126). DOI: 10.1186/1477-7827-12-126

Поступила в редакцию / Received 30.08.2022

Принята к публикации / Accepted 05.09.2022

Конфликт интересов. Автор заявляет об отсутствии конфликта интересов.

Conflict of interest. The author declares no conflict of interest.

Финансирование. Исследование проведено без спонсорской поддержки.

Financing. The study was conducted without sponsorship.

Все пациенты подписали **информированное согласие** на участие в исследовании.

The written consents to participation in the study of adults have been performed.

Вклад авторов.

Ж.Ю. Сапожкова – концепция, дизайн исследования, выполнение исследований, обзор литературы, редактирование, обработка и анализ результатов, перевод на английский – 100 %, разработка набора реагентов, разработка и корректировка протокола тестирования – 50 %.

К.И. Еремин – разработка тест-систем, разработка и корректировка протокола тестирования 50 %, производство и предоставление набора для исследований – 100 %.

О.И. Пацап – статистическая обработка результатов – 100 %.

Authors' contribution.

Zh.Y. Sapozhkova – main concept, research design of paper, assay performance, review writing, editing, outcomes analyzing, translation – 100 %, research & development of kit – 50 %.

K.I. Eremin – research and development of kit – 50 %, manufacture and presentation of kit for examination 100 %.

O.I. Patsap – statistical analyses 100 %.

Сведения об авторах / Information about authors



Жанна Юрьевна Сапожкова – к.м.н., руководитель Международной Школы Цитологии и Медицинской Школы Инноваций, Москва, Россия; руководитель клинко-диагностической лаборатории, Подольский диагностический центр, Подольск, Россия.

Zhanna Yu. Sapozhkova – MD, PhD, The International Cytology School & Innovatory Medical School, Head, Moscow, Russia; Medical Laboratory, Podolsk Diagnostic Center, Head, Podolsk, Russia.

E-mail: icsschool.2019@gmail.com. **SPIN РИНЦ:** 3191-4189

ORCID: 0000-0003-3068-2260



Константин Игоревич Еремин – к.х.н., специалист департамента научно-исследовательской лаборатории клинических разработок, Международная Школа Цитологии и Медицинская Школа Инноваций, Москва–С-Петербург, Россия.

Konstantin I. Eremin – PhD in Chemistry, International Cytology School & Innovatory Medical School, Specialist of Research & Development Department, Moscow–S-Petersburg, Russia.

E-mail: icsschool.2019@gmail.com.



Ольга Игоревна Пацап – к.м.н., научный сотрудник, Научно-образовательный ресурсный центр инновационных технологий иммунофенотипирования, цифрового пространственного профилирования и ультраструктурного анализа (молекулярной морфологии), ФГАОУ ВО «Российский университет дружбы народов», Москва, Россия.

Olga I. Patsap – MD, PhD, Scientific and Educational Resource Center for Innovative Technologies of Immunophenotyping, Digital Spatial Profiling and Ultrastructural Analysis (Molecular Morphology), Peoples' Friendship University of Russia, Researcher, Moscow, Russia.

E-mail: cleosnake@yandex.ru. **SPIN РИНЦ:** 6460-1758

ORCID: 0000-0003-4620-3922