

ISSN 1561-8323 (Print)  
ISSN 2524-2431 (Online)

**МЕДИЦИНА**  
**MEDICINE**

УДК 577.29:616.69-008.6:616.697  
<https://doi.org/10.29235/1561-8323-2023-67-4-307-314>

Поступило в редакцию 24.10.2022  
Received 24.10.2022

**И. Д. Кужель<sup>1</sup>, О. В. Прибушеня<sup>2</sup>, И. В. Наумчик<sup>2</sup>, И. В. Курлович<sup>2</sup>, Н. И. Рябоконе<sup>1</sup>**

<sup>1</sup>Институт генетики и цитологии Национальной академии наук Беларуси, Минск, Республика Беларусь

<sup>2</sup>Республиканский научно-практический центр «Мать и дитя», Минск, Республика Беларусь

**ДВУНИТЕВЫЕ РАЗРЫВЫ ДНК СПЕРМИЕВ У ПАЦИЕНТОВ  
С НОРМОЗООСПЕРМИЕЙ И ПАТОЗООСПЕРМИЕЙ**

(Представлено членом-корреспондентом Е. И. Слобожаниной)

**Аннотация.** С использованием нейтральной версии метода ДНК-комет изучены уровни двунитевых разрывов ДНК – грубых нарушений целостности генома – в образцах спермы мужчин из белорусской популяции при нормозооспермии и патозооспермии, включая астенозооспермию, олигозооспермию, олигоастенозооспермию и другие смешанные формы патозооспермии. Показано, что двунитевые разрывы ДНК составляют большую долю (в среднем около 44–50 %) от общего количества повреждений ДНК (одно- и двунитевых разрывов, щелочно-лабильных сайтов и др.), регистрируемых с использованием щелочной версии метода ДНК-комет, рекомендованной Всемирной организацией здравоохранения. Установлены более высокие уровни двунитевых разрывов ДНК спермиев в группе с патозооспермией и подгруппе с астенозооспермией, чем при нормозооспермии. Показано также, что зарегистрированные при патозооспермии уровни двунитевых разрывов соответствуют мутагенному эффекту *in vitro* высоких концентраций (10–30 мкг/мл) мощного радиомиметика сульфата блеомицина, что свидетельствует о существенном нарушении целостности ДНК при патозооспермии. В целом полученные данные говорят о возможности использования анализа двунитевых разрывов ДНК спермиев в диагностике мужского бесплодия.

**Ключевые слова:** двунитевые разрывы ДНК спермиев, метод ДНК-комет, нормозооспермия, патозооспермия, мужское бесплодие

**Для цитирования.** Двунитевые разрывы ДНК спермиев у пациентов с нормозооспермией и патозооспермией / И. Д. Кужель [и др.] // Докл. Нац. акад. наук Беларуси. – 2023. – Т. 67, № 4. – С. 307–314. <https://doi.org/10.29235/1561-8323-2023-67-4-307-314>

**Irena D. Kuzhal<sup>1</sup>, Oksana V. Pribushenya<sup>2</sup>, Irina V. Naumchik<sup>2</sup>, Ivan V. Kurlovich<sup>2</sup>, Nadezhda I. Ryabokon<sup>1</sup>**

<sup>1</sup>Institute of Genetics and Cytology of the National Academy of Sciences of Belarus, Minsk, Republic of Belarus

<sup>2</sup>Scientific and Practical Center “Mother and Child”, Minsk, Republic of Belarus

**SPERM DOUBLE-STRAND DNA BREAKS IN PATIENTS WITH NORMOZOOSPERMIA  
AND PATHOZOOSPERMIA**

(Communicated by Corresponding Member Ekaterina I. Slobozhanina)

**Abstract.** The levels of double-strand DNA breaks as a severe disruption of genome integrity were studied using the neutral version of the comet assay in the sperm samples of the men of the Belarusian population with normozoospermia and pathozoospermia, including asthenozoospermia, oligozoospermia, oligoasthenozoospermia, and other combined forms of pathozoospermia. It was demonstrated that double-strand DNA breaks have a large proportion (about 44–50 % on average) of the total number of DNA damage (single- and double-strand breaks, alkaline-labile sites, etc.) analyzed with the alkaline version of the comet assay recommended by the World Health Organization. Higher levels of sperm double-strand DNA breaks were established in the pathozoospermia group and in asthenozoospermia subgroup compared to the normozoospermia group. It was also shown that the levels of double-strand breaks observed at pathozoospermia correspond to the mutagenic effect *in vitro* of high concentrations (10–30 µg/ml) of bleomycin sulfate that acts as a strong radiomimetic, which points to a significant disruption of the DNA integrity at pathozoospermia. In general, the data obtained demonstrate the usefulness of the sperm double-strand DNA break analysis for male infertility diagnostics.

**Keywords:** double-strand sperm DNA breaks, comet assay, normozoospermia, pathozoospermia, male infertility

**For citation.** Kuzhal I. D., Pribushenya O. V., Naumchik I. V., Kurlovich I. V., Ryabokon N. I. Sperm double-strand DNA breaks in patients with normozoospermia and pathozoospermia. *Doklady Natsional'noi akademii nauk Belarusi = Doklady of the National Academy of Sciences of Belarus*, 2023, vol. 67, no. 4, pp. 307–314 (in Russian). <https://doi.org/10.29235/1561-8323-2023-67-4-307-314>

**Введение.** Молекулярно-генетический анализ целостности (или фрагментации) ядерной ДНК спермиев является полезным инструментом как для диагностики мужского фактора бесплодия, так и для использования в программах вспомогательных репродуктивных технологий (ВРТ). Множество научных публикаций демонстрирует, что анализ целостности ДНК спермиев является независимым тестом для оценки качества спермы, существенно дополняя показания спермограммы. Несмотря на продолжающиеся дискуссии вокруг использования фрагментации ДНК в клинической практике, ряд экспертов в области мужского бесплодия полагают, что за последние 40 лет ни одна из новых технологий не предоставила столько клинически важных данных для оценки мужской фертильности, сколько анализ фрагментации ДНК в мужских гаметах [1; 2]. С 2021 г. тестирование фрагментации ДНК спермиев рекомендовано Всемирной организацией здравоохранения (ВОЗ) для оценки качества спермы в андрологии и в клинических лабораториях, использующих ВРТ [3].

Выделяют следующие основные причины возникновения фрагментации ДНК спермиев: дефекты в компактизации хромосом и в механизмах репарации ДНК в течение сперматогенеза, незавершенный апоптоз, окислительный стресс, мутагены окружающей среды, нездоровый образ жизни, включая курение, употребление алкоголя, плохое питание, а также старение, инфекционные заболевания и другие неблагоприятные факторы. При этом возникает широкий спектр повреждений ДНК: одностранные и двустранные разрывы в молекуле ДНК, окислительные повреждения оснований ДНК, апуриновые-апириимидиновые сайты и др. Все они с высокой частотой встречаются в сперматозоидах мужчин и могут возникать в течение сперматогенеза, спермиогенеза, транзита сперматозоидов в эпидидимис и даже после эякуляции до слияния ядер яйцеклетки и сперматозоида. Причины и механизмы их возникновения могут совпадать или нет, а сами повреждения разных типов могут вносить различный вклад в снижение мужской фертильности [4; 5].

В связи с различной клинической значимостью повреждений ДНК отмечается, что двустранные разрывы ДНК спермиев являются наиболее грубыми нарушениями генома и, несмотря на свое относительно меньшее количество по сравнению с одностранными разрывами, они могут иметь летальный эффект для зиготы до или после имплантации, а также влиять на качество эмбрионов [4; 6]. Обсуждается как возможность [4], так и невозможность [6] репарации этих повреждений после оплодотворения в процессе материнской репарации ДНК (maternal DNA repair). Среди причин, препятствующих материнской репарации, приводится факт отсутствия слияния материнского пронуклеуса с отцовским, несущим двустранные разрывы ДНК [6]. Хорошо известно также, что двустранные разрывы ДНК являются причиной задержки клеточного цикла и что даже при небольшом их количестве наблюдается задержка деления в культуре клеток человека [7]. В то же время именно с двустранными разрывами ДНК, потенциально влияющими на клеточный цикл, ассоциированы снижение частоты имплантации и отставание в эмбриональном развитии [8], а также снижение частоты клинической беременности при использовании технологии ИКСИ – внутрицитоплазматической инъекции сперматозоида в ооцит [9]. И обратное: при низкой частоте двустранных разрывов ДНК спермиев показана высокая успешность рождения после использования технологии внутриматочного оплодотворения [10]. Эти исследования прямо или косвенно свидетельствуют о негативном эффекте двустранных разрывов ДНК спермиев на эффективность ВРТ.

Кроме того, имеются данные, напрямую указывающих на возможность использования двустранных разрывов ДНК спермиев в диагностических целях при пониженной мужской фертильности. Так, установлены повышенные уровни двустранных разрывов ДНК в спермиях мужчин из супружеских пар с привычным невынашиванием беременности, у которых женский фактор бесплодия был исключен и поставлен диагноз мужского идиопатического бесплодия [11].

Таким образом, накопленные литературные данные свидетельствуют о том, что двунитевые разрывы имеют более высокий потенциал для возникновения негативных репродуктивных эффектов по сравнению с однопитевыми разрывами ДНК, а дифференциальная оценка двунитевых разрывов может дать дополнительную информацию о мужской фертильности. Однако имеющихся данных об уровнях двунитевых разрывов в спермиях мужчин в норме и при пониженной фертильности крайне недостаточно, чтобы использовать их в клинической практике.

Широко применяемые и рекомендованные ВОЗ тесты для оценки фрагментации ДНК спермиев [3] не позволяют проводить дифференциальный анализ двунитевых разрывов ДНК. Так, тест с использованием акридинового оранжевого (acridine orange test), скорее всего, обнаруживает только однопитевые разрывы ДНК, тесты TUNEL (terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP nick end labeling) и SCD (sperm chromatin dispersion test или Halo test) одновременно учитывают одно- и двунитевые разрывы ДНК, а щелочная версия метода ДНК-комет (comet assay) позволяет одновременно регистрировать широкий спектр повреждений ДНК: одно- и двунитевые разрывы ДНК, а также щелочно-лабильные сайты (апуриновые-апириимидиновые сайты, модифицированные основания ДНК) и другие повреждения ДНК, тем самым демонстрируя свою высокую чувствительность при оценке целостности ДНК [5; 12].

Целью настоящего исследования было изучение двунитевых разрывов ДНК в спермиях мужчин с нормозооспермией и патозооспермией и оценка их диагностической значимости при пониженной мужской фертильности.

**Материалы и методы исследования.** Образцы спермы пациентов с нормо- и патозооспермией в общем количестве 78 единиц получены в 2021 г. из коллекций Республиканского банка ДНК человека, животных, растений и микроорганизмов (Институт генетики и цитологии НАН Беларуси). Постановка диагноза пациентам выполнена в 2013–2015 гг. по результатам спермограммы, полученной с использованием автоматического анализатора SQA-V (Medical Electronic Systems, Израиль), и на основании рекомендаций ВОЗ 2010 г. Все участники исследования являются белорусами по национальности, согласно проведенному в 2013–2015 гг. анкетированию. Полученные из банка образцы составили группы и подгруппы исследования, основные клинико-демографические характеристики которых представлены в табл. 1.

Таблица 1. Основные характеристики исследуемых групп

Table 1. Basic characteristics of study groups

Исследуемые группы Study groups	Количество пациентов Number of patients	Возраст, годы Age, years		
		Среднее значение ± ошибка среднего Mean ± SE	Медиана (минимальное – максимальное значение) Median (min–max)	<i>U</i> test, <i>p</i>
Нормозооспермия	34	31,4 ± 0,9	30,5 (23–46)	–
Патозооспермия, в т. ч.:	44	33,4 ± 1,0	32,0 (23–50)	>0,05
астенозооспермия	23	34,7 ± 1,5	32,0 (25–50)	>0,05
олигоастенозооспермия	9	33,0 ± 2,2	30,0 (23–41)	>0,05
олигозооспермия	5	30,2 ± 2,2	29,0 (25–37)	>0,05
астенотератозооспермия	5	32,4 ± 2,7	35,0 (26–39)	>0,05
олигоастенотератозооспермия	2	29,5 ± 0,5	29,5 (29–30)	>0,05

Для одновременной оценки широкого спектра повреждений ДНК (одно- и двунитевых разрывов, а также щелочно-лабильных сайтов ДНК и др.) использовали щелочную версию метода ДНК-комет, рекомендованную ВОЗ [3], с небольшими модификациями, описанными в инструкции по применению, утвержденной в 2016 г. Министерством здравоохранения Республики Беларусь<sup>1</sup>. Метод состоит из следующих основных этапов: (1) погружение клеток в 1 %-ную

<sup>1</sup> Метод диагностики генетически обусловленных форм мужского бесплодия: Инструкция по применению / О. В. Прибушена [и др.]; Мин-во здравоохранения Респ. Беларусь, рег. № 196-1115 от 18.03.2016 [Электронный ресурс]. – Режим доступа: <http://med.by/methods/book.php?book=2110>. – Дата доступа: 29.09.2022.

легкоплавкую агарозу, приготовленную на фосфатном солевом буфере, и наслаивание полученной суспензии клеток на цитологические стекла, покрытые 0,5 %-ной агарозой с нормальной температурой плавления; (2) лизис в растворе 2,5 М NaCl, 0,1 М EDTA, 10 mM Tris, 1 % Triton X-100, 10 % DMSO, 0,056 мг/мл протеиназы К, 5,0  $\mu$ М дитиотреитола (DTT) при 30 °С; (3) денатурация ДНК в буфере для электрофореза, содержащем 300 mM NaOH, 1 mM EDTA, pH  $\geq$  13, 4 °С; (4) горизонтальный электрофорез в камере для ДНК-комет «CSL-COM20» (Cleaver Scientific, Великобритания) при 4 °С, 0,7–0,8 В на 1 см расстояния между электродами и силе тока до 300 мА; (5) нейтрализация буфера для электрофореза в растворе 0,4 М Tris, pH = 7,4, 4 °С; (6) фиксация препаратов в 96 %-ном этиловом спирте, предварительно охлажденном до –20 °С; (7) окраска препаратов бромистым этидием в концентрации 20 мкг/мл и анализ повреждений ДНК с помощью флуоресцентного микроскопа BX51 (производства Olympus, Япония) при 400-кратном увеличении, фильтре возбуждения на 515–560 нм и барьерном фильтре на 590 нм; каждый образец спермы приготовлен и проанализирован на 2–3 цитологических стеклах. Результаты анализа представлены как уровни фрагментации ДНК, выраженные в условных единицах (усл. ед.) и отражающие нагруженность клеток повреждениями ДНК, а также как индекс фрагментации (DFI – DNA fragmentation index), выраженный в процентах и описывающий частоту клеток с повреждениями ДНК.

Для целевой (дифференциальной) оценки двунитевых разрывов ДНК была использована нейтральная версия ДНК комет, применяемая на различных типах клеток, в т. ч. на спермиях мужчин (обзор публикаций в [4; 5]). Основные этапы этого метода аналогичны щелочной версии ДНК-комет, описанной выше. Принципиальные отличия нейтральной версии метода состоят в проведении следующих этапов, выполненных по описанию, представленному в [13]: (этапы 3 и 4) денатурация и электрофорез ДНК в нейтральном буфере (5xTBE, pH = 7,5); (5) смывание нейтрального буфера в 0,9 %-ном растворе NaCl.

В качестве положительного контроля для двунитевых разрывов ДНК использовали образцы спермы ( $n = 2$ ) с нормозооспермией, обработанные *in vitro* в течение 1 ч во влажном контейнере при 37 °С различными концентрациями блеомицина сульфата (EDQM, France, catalog code: B1141000) – сильного радиомиметика, который признан индуктором двунитевых разрывов ДНК.

Статистическая обработка данных выполнена в пакете прикладных программ Statistica 7.0 (StatSoft, США) с использованием возможностей описательной статистики и сравнительного анализа групп. Исследуемые параметры были проверены на нормальность распределения с использованием теста Колмогорова–Смирнова. Поскольку распределение по ряду исследуемых признаков отличалось от нормального, дальнейший сравнительный анализ выполнен с использованием непараметрического теста Манна–Уитни ( $U$  теста). Все значения  $p < 0,05$  признавались за статистически значимые.

Для наглядного представления данных использованы также графические возможности пакета Excel для Windows.

**Результаты и их обсуждение.** Сформированные группы и подгруппы исследования (табл. 1) не различались по возрасту ( $U$ -test,  $p > 0,05$ ). Медианный возраст для основных групп исследования с нормо- и патозооспермией составлял соответственно 30,5 и 32,0 года, а для подгрупп с патозооспермией находился в диапазоне 29,0–32,0. Минимальные и максимальные значения в группах составляли 23 года и 46 (или 50) лет соответственно. В группе с патозооспермией наиболее многочисленными ( $n = 23$ , или 52,3 %) были случаи с диагнозом астенозооспермия (пониженная подвижность спермиев), что позволило использовать эту подгруппу для дальнейшего статистического анализа. Остальные 4 подгруппы были малочисленными (табл. 1).

Результаты исследования фрагментации ДНК представлены в табл. 2. Оба теста: нейтральная и щелочная версия ДНК-комет – показали повышенные уровни фрагментации ДНК в группе с патозооспермией и в ее подгруппе с максимальной выборкой и диагнозом астенозооспермия по сравнению с группой мужчин, имеющих диагноз нормозооспермия. При этом уровни значимости результатов сравнительного анализа имели высокие значения ( $p \leq 2,0 \cdot 10^{-6}$ ), свидетельствуя в пользу эффективности использования нейтральной и щелочной версий ДНК-комет для диагностики качества спермы и мужской фертильности. В малочисленных подгруппах с патозооспермией

сохранялась тенденция к многократному повышению уровней двунитевых разрывов ДНК по сравнению с нормозооспермией.

Рассматривая детально результаты исследования фрагментации ДНК, следует обратить внимание на несколько моментов.

Таблица 2. Фрагментация ДНК спермиев у мужчин с нормозооспермией и патозооспермией при использовании нейтральной и щелочной версий ДНК-комет

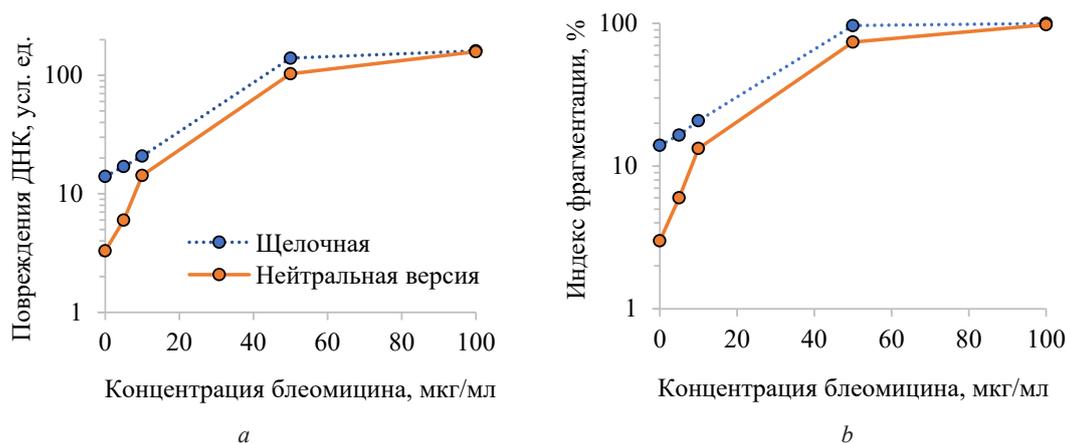
Table 2. Sperm DNA fragmentation in men with normozoospermia and pathozoospermia analyzed with the neutral and alkaline versions of the comet assay

Исследуемые группы Study groups	Количество пациентов Number of patients	Повреждения ДНК (усл. ед.) DNA damage (a. u.)			Индекс фрагментации ДНК (DFI, %) DNA fragmentation index (DFI, %)		
		Среднее значение ± ошибка среднего Mean ± SE	Медиана (минимальное – максимальное значение) Median (min–max)	<i>U</i> -test, <i>p</i>	Среднее значение ± ошибка среднего Mean ± SE	Медиана (минимальное – максимальное значение) Median (min–max)	<i>U</i> -test, <i>p</i>
<i>Нейтральная версия ДНК-комет (обнаружение двунитевых разрывов ДНК)</i>							
Нормозооспермия	34	4,6 ± 0,5	4,3 (0,0–11,5)	–	4,4 ± 0,5	4,3 (0,0–10,0)	–
Патозооспермия, в т. ч.	44	31,7 ± 6,8	13,3 (2,0–235,5)	2,3 · 10 <sup>-8</sup>	19,5 ± 2,8	12,3 (2,0–83,0)	2,7 · 10 <sup>-8</sup>
астенозооспермия	23	34,9 ± 8,2	18,0 (2,5–157,5)	1,8 · 10 <sup>-7</sup>	22,3 ± 4,1	14,0 (2,5–83,0)	3,0 · 10 <sup>-7</sup>
<i>Щелочная версия ДНК-комет (обнаружение одно- и двунитевых разрывов ДНК и щелочно-лабильных сайтов ДНК)</i>							
Нормозооспермия	34	11,2 ± 1,3	9,0 (2,7–35,0)	–	11,1 ± 1,3	9,0 (2,7–34,0)	–
Патозооспермия, в т. ч.	44	105,9 ± 18,9	66,5 (3,0–400,0)	6,1 · 10 <sup>-7</sup>	56,9 ± 6,0	63,5 (3,0–100,0)	6,6 · 10 <sup>-7</sup>
астенозооспермия	23	138,1 ± 30,5	71,3 (3,0–400,0)	2,0 · 10 <sup>-6</sup>	60,7 ± 7,8	72,7 (3,0–100,0)	2,0 · 10 <sup>-6</sup>

Во-первых, при щелочной версии метода ДНК-комет, позволяющей проводить суммарную оценку одно- и двунитевых разрывов ДНК, а также щелочно-лабильных сайтов, уровни фрагментации ДНК и индекс фрагментации (DFI) в группе с нормозооспермией не превышали пороговых значений, описанных в [5], а также в инструкции по применению, утвержденной Министерством здравоохранения Республики Беларусь. В то же время в группе с патозооспермией уровни повреждений ДНК и DFI были в среднем в 7–8 раз выше, чем в норме, достигая максимальных значений (соответственно 400 усл. ед. и 100 %) у отдельных пациентов (табл. 2) и тем самым свидетельствуя о невозможности сохранения жизнеспособности этими клетками.

Во-вторых, при использовании нейтральной версии ДНК-комет установлено, что в группе с нормозооспермией количество двунитевых разрывов ДНК находится на низком уровне. Так, медианное значение для нагруженности клеток двунитевыми разрывами при нормозооспермии составляет 4,3 усл. ед. (диапазон значений от 0 до 11,5), а для количества спермиев, несущих двунитевые разрывы (индекс фрагментации или DFI), медиана также составляет 4,3 % (диапазон – от 0 до 10 %). В то же время в группе с патозооспермией зарегистрированное нами среднее значение индекса фрагментации вследствие двунитевых разрывов ДНК составляло 19,5 ± 2,8 %, что очень близко к 16,7 %, которые описаны у мужчин из супружеских пар, проходивших циклы ВРТ [14]. В целом, нейтральная версия ДНК комет показала, что в группе с патозооспермией уровни двунитевых разрывов ДНК и DFI были в 3–4 раза выше, чем при нормозооспермии, и имеют широкий диапазон индивидуальных значений, приближаясь к максимальным значениям (табл. 2).

Первичная сравнительная оценка медианных (и средних) значений двунитевых разрывов ДНК (табл. 2) с полученной нами кривой зависимости «концентрация–эффект» после обработки спермиев сульфатом блеомицином (рисунок) позволила сделать предварительные выводы о том, что поврежденность ДНК сперматозоидов двунитевыми разрывами в группе с патозооспермией соответствовала таким уровням, которые могли быть индуцированы мутагенным воздействием сульфата блеомицина в концентрациях 10–30 мкг/мл, что подтверждает высокую степень нарушения целостности ДНК сперматозоидов при пониженной фертильности.



Зависимость концентрация–эффект для уровня повреждений ДНК (a) и индекса фрагментации ДНК (b), оцененных с использованием щелочной (пунктирная линия) и нейтральной версий (сплошная линия) ДНК-комет в сперматозоидах мужчин с диагнозом нормозооспермия ( $n = 2$ ) после обработки *in vitro* различными концентрациями сульфата блеомицина. Ось y представлена в логарифмической шкале

Concentration-effect relationship for the level of DNA damage (a) and the DNA fragmentation index (b) assessed with the alkaline (dotted line) and neutral versions (solid line) of the comet assay in spermatozoa of men with normozoospermia ( $n = 2$ ) after *in vitro* treatment with various concentrations of bleomycin sulfate. The y-axis is presented on a logarithmic scale

Доля двунитевых разрывов в общем пуле повреждений ДНК была неожиданно высокой и составляла в среднем около 50 и 44 % в группе с нормозооспермией и патозооспермией соответственно. При этом индивидуальные колебания доли двунитевых разрывов находились в диапазоне 0,0–100,0 % в группе с нормозооспермией и 3,9–100,0 % у пациентов с патозооспермией. Широкий диапазон как абсолютного уровня (табл. 2), так и доли двунитевых разрывов может указывать на независимую от показаний спермограммы диагностическую ценность анализа двунитевых разрывов ДНК при поиске генетических причин мужского бесплодия.

Для диагностики генетических причин пониженной мужской фертильности в качестве референсных уровней двунитевых разрывов ДНК могут быть приняты рассчитанные нами в группе с нормозооспермией верхние значения 95 %-ного доверительного интервала, равные с округлением 5 усл. ед. для разрывов ДНК и 5 % для индекса фрагментации. При этом около 24 % исследуемых образцов (8 с нормозооспермией и 11 с патозооспермией) с низкими значениями общей фрагментации ДНК (в пределах нормы – до 22 усл. ед.) имели двунитевые разрывы в количестве выше предлагаемого референсного уровня. С учетом большого негативного эффекта двунитевых разрывов ДНК на жизнеспособность гамет и эмбрионов, это указывает на необходимость дифференциальной (целевой) оценки повреждений ДНК даже при нормальных значениях общей фрагментации ДНК сперматозоидов.

**Заключение.** Таким образом, в ходе проведенного исследования впервые описаны уровни двунитевых разрывов ДНК в сперме при нормо- и патозооспермии у мужчин белорусской популяции. Показано, что двунитевые разрывы ДНК, анализируемые с использованием нейтральной версии ДНК-комет, составляют большую долю (в среднем около 44–50 %) от общего количества повреждений ДНК, анализируемых как фрагментация ДНК с использованием щелочной версии ДНК-комет, рекомендованной ВОЗ в 2021 г. для оценки качества спермы. Установлено, что у мужчин с патозооспермией среднее количество двунитевых разрывов статистически значимо в 3–4 раза выше, чем при нормозооспермии. При этом уровни повреждения ДНК в этой группе мужчин соответствуют эффектам высоких доз радиомиметика сульфата блеомицина. В целом, результаты проведенного исследования свидетельствуют о нагруженности спермиев двунитевыми разрывами ДНК, о связи между двунитевыми разрывами и мужской фертильностью, а также о необходимости проведения дальнейших исследований с целью возможного использования анализа данного типа повреждений ДНК для диагностики мужского бесплодия, а также для увеличения эффективности использования ВРТ.

**Благодарности.** Работа выполнена в рамках задания 2.2.5 «Изучение спектра повреждений ДНК спермиев при пониженной мужской фертильности» Государственной программы научных исследований «Биотехнологии-2» (2021–2025 гг.). Авторы выражают благодарность Н. В. Никитченко и Н. В. Савиной – научным сотрудникам Института генетики и цитологии НАН Беларуси, участвующим в формировании коллекций образцов спермы, используемой в данной работе.

**Acknowledgements.** The work was performed within the framework of project 2.2.5 “Study of the spectrum of sperm DNA damage in reduced male fertility” of the State Research Program “Biotechnology-2” (2021–2025). The authors are grateful to N. V. Nikitchenko and N. V. Savina – researchers of the Institute of Genetics and Cytology of the National Academy of Sciences of Belarus who participated in the formation of sperm sample collections used in this work.

### Список использованных источников

1. O’Neill, C. L. A worldwide profile of the utilization of sperm DNA fragmentation testing in relation to reproductive outcome / C. L. O’Neill, G. D. Palermo // *Translational Andrology and Urology*. – 2017. – Vol. 6, N 4. – P. 320–321. <https://doi.org/10.21037/tau.2017.09.14>
2. Zini, A. The benefits and limitations of sperm DNA testing in clinical practice / A. Zini // *Translational Andrology and Urology*. – 2017. – Vol. 6, N 4. – P. 326–327. <https://doi.org/10.21037/tau.2017.09.09>
3. World Health Organization. WHO laboratory manual for the examination and processing of human semen. 6th ed. – Geneva, Switzerland: World Health Organization; 2021. – 276 p.
4. The impact of single- and double-strand DNA breaks in human spermatozoa on assisted reproduction / A. Agarwal [et al.] // *International Journal of Molecular Sciences*. – 2020. – Vol. 21, N 11. – Art. 3882. <https://doi.org/10.3390/ijms21113882>
5. Sperm DNA fragmentation testing: Summary evidence and clinical practice recommendations / S. C. Esteves [et al.] // *Andrologia*. – 2021. – Vol. 53, N 2. – Art. e13874. <https://doi.org/10.1111/and.13874>
6. Ribas-Maynou, J. Single and double strand sperm DNA damage: different reproductive effects on male fertility / J. Ribas-Maynou, J. Benet // *Genes*. – 2019. – Vol. 10, N 2. – Art. 105. <https://doi.org/10.3390/genes10020105>
7. A limited number of double-strand DNA breaks is sufficient to delay cell cycle progression / J. van den Berg [et al.] // *Nucleic Acids Research*. – 2018. – Vol. 46, N 19. – P. 10132–10144. <https://doi.org/10.1093/nar/gky786>
8. Double-stranded sperm DNA damage is a cause of delay in embryo development and can impair implantation rates / A. Casanovas [et al.] // *Fertility and Sterility*. – 2019. – Vol. 111, N 4. – P. 699–707. <https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2018.11.035>
9. DNA double strand breaks in human spermatozoa can be predictive for assisted reproductive outcome / A. Garolla [et al.] // *Reproductive BioMedicine Online*. – 2015. – Vol. 31, N 1. – P. 100–107. <https://doi.org/10.1016/j.rbmo.2015.03.009>
10. Investigating the level of DNA double-strand break in human spermatozoa and its relation to semen characteristics and IVF outcome using phospho-histone H2AX antibody as a biomarker / O. Coban [et al.] // *Andrology*. – 2020. – Vol. 8, N 2. – P. 421–426. <https://doi.org/10.1111/andr.12689>
11. Double stranded sperm DNA breaks, measured by Comet assay, are associated with unexplained recurrent miscarriage in couples without a female factor / J. Ribas-Maynou [et al.] // *PLoS One*. – 2012. – Vol. 7, N 9. – Art. e44679. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0044679>
12. Clinical utility of sperm DNA fragmentation testing: practice recommendations based on clinical scenarios / A. Agarwal [et al.] // *Translational Andrology and Urology*. – 2016. – Vol. 5, N 6. – P. 935–950. <https://doi.org/10.21037/tau.2016.10.03>
13. Double-stranded DNA breaks hidden in the neutral Comet assay suggest a role of the sperm nuclear matrix in DNA integrity maintenance / J. Ribas-Maynou [et al.] // *Molecular Human Reproduction*. – 2014. – Vol. 20, N 4. – P. 330–340. <https://doi.org/10.1093/molehr/gat090>
14. The ability of sperm selection techniques to remove single- or double-strand DNA damage / M. Enciso [et al.] // *Asian Journal of Andrology*. – 2011. – Vol. 13, N 5. – P. 764–768. <https://doi.org/10.1038/aja.2011.46>

### References

1. O’Neill C. L., Palermo G. D. A worldwide profile of the utilization of sperm DNA fragmentation testing in relation to reproductive outcome. *Translational Andrology and Urology*, 2017, vol. 6, no. 4, pp. 320–321. <https://doi.org/10.21037/tau.2017.09.14>
2. Zini A. The benefits and limitations of sperm DNA testing in clinical practice. *Translational Andrology and Urology*, 2017, vol. 6, no. 4, pp. 326–327. <https://doi.org/10.21037/tau.2017.09.09>
3. *World Health Organization. WHO laboratory manual for the examination and processing of human semen*. 6th ed. Geneva, Switzerland, 2021. 276 p.
4. Agarwal A., Barbăroşie C., Ambar R., Finelli R. The impact of single- and double-strand DNA breaks in human spermatozoa on assisted reproduction. *International Journal of Molecular Sciences*, 2020, vol. 21, no. 11, art. 3882. <https://doi.org/10.3390/ijms21113882>
5. Esteves S. C., Zini A., Coward R. M., Evenson D. P., Gosálvez J., Lewis S. E. M., Sharma R., Humaidan P. Sperm DNA fragmentation testing: Summary evidence and clinical practice recommendations. *Andrologia*, 2021, vol. 53, no. 2, art. e13874. <https://doi.org/10.1111/and.13874>
6. Ribas-Maynou J., Benet J. Single and double strand sperm DNA damage: different reproductive effects on male fertility. *Genes*, 2019, vol. 10, no. 2, art. 105. <https://doi.org/10.3390/genes10020105>

7. van den Berg J., Manjón A. G., Kielbassa K., Feringa F. M., Freire R., Medema R. H. A limited number of double-strand DNA breaks is sufficient to delay cell cycle progression. *Nucleic Acids Research*, 2018, vol. 46, no. 19, pp. 10132–10144. <https://doi.org/10.1093/nar/gky786>

8. Casanovas A., Ribas-Maynou J., Lara-Cerrillo S., Jimenez-Macedo A. R., Hortal O., Benet J., Carrera J., García-Peiró A. Double-stranded sperm DNA damage is a cause of delay in embryo development and can impair implantation rates. *Fertility and Sterility*, 2019, vol. 111, no. 4, pp. 699–707. <https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2018.11.035>

9. Garolla A., Cosci I., Bertoldo A., Sartini B., Boudjema E., Foresta C. DNA double strand breaks in human spermatozoa can be predictive for assisted reproductive outcome. *Reproductive BioMedicine Online*, 2015, vol. 31, no. 1, pp. 100–107. <https://doi.org/10.1016/j.rbmo.2015.03.009>

10. Coban O., Serdarogullari M., Yarkiner Z., Serakinci N. Investigating the level of DNA double-strand break in human spermatozoa and its relation to semen characteristics and IVF outcome using phospho-histone H2AX antibody as a biomarker. *Andrology*, 2020, vol. 8, no. 2, pp. 421–426. <https://doi.org/10.1111/andr.12689>

11. Ribas-Maynou J., García-Peiró A., Fernandez-Encinas A., Amengual M. J., Prada E., Cortés P., Navarro J., Benet J. Double stranded sperm DNA breaks, measured by Comet assay, are associated with unexplained recurrent miscarriage in couples without a female factor. *PLoS One*, 2012, vol. 7, no. 9, art. e44679. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0044679>

12. Agarwal A., Majzoub A., Esteves S. C., Ko E., Ramasamy R., Zini A. Clinical utility of sperm DNA fragmentation testing: practice recommendations based on clinical scenarios. *Translational Andrology and Urology*, 2016, vol. 5, no. 6, pp. 935–950. <https://doi.org/10.21037/tau.2016.10.03>

13. Ribas-Maynou J., Gawecka J. E., Benet J., Ward W. S. Double-stranded DNA breaks hidden in the neutral Comet assay suggest a role of the sperm nuclear matrix in DNA integrity maintenance. *Molecular Human Reproduction*, 2014, vol. 20, no. 4, pp. 330–340. <https://doi.org/10.1093/molehr/gat090>

14. Enciso M., Iglesias M., Galán I., Sarasa J., Gosálvez A., Gosálvez J. The ability of sperm selection techniques to remove single- or double-strand DNA damage. *Asian Journal of Andrology*, 2011, vol. 13, no. 5, pp. 764–768. <https://doi.org/10.1038/aja.2011.46>

### Информация об авторах

*Кужель Ирена Дмитриевна* – мл. науч. сотрудник. Институт генетики и цитологии НАН Беларуси (ул. Академическая, 27, 220072, Минск, Республика Беларусь). E-mail: [i.hileuskaya@igc.by](mailto:i.hileuskaya@igc.by).

*Прибушеня Оксана Владимировна* – д-р мед. наук, доцент, заведующий лабораторией. РНПЦ «Мать и дитя» (ул. Орловская, 66, 220053, Минск, Республика Беларусь). E-mail: [pribushenya@yandex.ru](mailto:pribushenya@yandex.ru).

*Наумчик Ирина Всеволодовна* – канд. мед. наук, заместитель директора. РНПЦ «Мать и дитя» (ул. Орловская, 66, 220053, Минск, Республика Беларусь). E-mail: [belgenetics@yahoo.com](mailto:belgenetics@yahoo.com).

*Курлович Иван Васильевич* – канд. мед. наук, заместитель директора. РНПЦ «Мать и дитя» (ул. Орловская, 66, 220053, Минск, Республика Беларусь). E-mail: [info@medcenter.by](mailto:info@medcenter.by).

*Рябокоть Надежда Ивановна* – канд. биол. наук, заведующий лабораторией. Институт генетики и цитологии НАН Беларуси (ул. Академическая, 27, 220072, Минск, Республика Беларусь). E-mail: [n.ryabokon@igc.by](mailto:n.ryabokon@igc.by).

### Information about authors

*Kuzhal Irena D.* – Junior Researcher. Institute of Genetics and Cytology of the National Academy of Sciences of Belarus (27, Akademicheskaya Str., 220072, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: [i.hileuskaya@igc.by](mailto:i.hileuskaya@igc.by).

*Pribushenya Oksana V.* – D. Sc. (Medicine), Associate Professor, Head of the Laboratory. State Republican Scientific and Practical Center “Mother and Child” (66, Orlovskaya Str., 220053, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: [pribushenya@yandex.ru](mailto:pribushenya@yandex.ru).

*Naumchik Irina V.* – Ph. D. (Medicine), Deputy Director. State Republican Scientific and Practical Center “Mother and Child” (66, Orlovskaya Str., 220053, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: [belgenetics@yahoo.com](mailto:belgenetics@yahoo.com).

*Kurlovich Ivan V.* – Ph. D. (Medicine), Deputy Director. State Republican Scientific and Practical Center “Mother and Child” (66, Orlovskaya Str., 220053, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: [info@medcenter.by](mailto:info@medcenter.by).

*Ryabokon Nadezhda I.* – Ph. D. (Biology), Head of the Laboratory. Institute of Genetics and Cytology of the National Academy of Sciences of Belarus (27, Akademicheskaya Str., 220072, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: [n.ryabokon@igc.by](mailto:n.ryabokon@igc.by).