

© ПЛОСКОНОС М.В., 2014

УДК 616.69-008.8-074

Плосконос М.В.

## ПРИМЕНЕНИЕ ЭОЗИНА И ЙОДИСТОГО ПРОПИДИЯ ДЛЯ ОЦЕНКИ ЖИЗНЕСПОСОБНОСТИ СПЕРМАТОЗОИДОВ ЧЕЛОВЕКА

ГБОУ ВПО «Астраханская государственная медицинская академия» Минздрава России, 414000, Астрахань, Россия

*Цель работы – сравнительное определение жизнеспособности сперматозоидов по состоянию проницаемости мембран для эозина (ЭО) и пропидия йодида (PI) и сопоставление результатов, полученных методами световой и флуоресцентной микроскопии. Сравнение данных световой микроскопии с окраской ЭО и флуоресцентной микроскопии с окраской PI показало, что процентное содержание сперматозоидов, выделенных из эякулятов 28 фертильных мужчин, окрашенных ЭО, было достоверно выше ( $34,8 \pm 3,2$ ), чем процентное содержание сперматозоидов, окрашенных PI ( $21,1 \pm 4,0$ ). После инкубации сперматозоидов при комнатной температуре в течение 24 ч процент нежизнеспособных клеток, окрашенных ЭО, был также выше, чем при окрашивании PI – соответственно  $44,5 \pm 3,3$  и  $34,7 \pm 3,6$ . Изучение жизнеспособности сперматозоидов при повреждающем действии на мембрану клетки оксидативного стресса, создаваемого 4-часовой инкубацией с 200 мкМ перекиси водорода ( $H_2O_2$ ), показало, что при окрашивании сперматозоидов PI выявляется существенно более высокий процент поврежденных клеток, а ЭО в этих случаях менее пригоден для выявления жизнеспособности сперматозоидов ( $73,6 \pm 5,8$  против  $51,7 \pm 6,4$ ). Проведенный эксперимент показывает, что в случае определенных воздействий на сперматозоиды (например, воздействие оксидативного стресса) световая микроскопия недостаточно адекватно отражает степень повреждения мембран сперматозоидов, а при флуоресцентной микроскопии выявляется более высокий процент сперматозоидов с поврежденной мембраной.*

**Ключевые слова:** жизнеспособность сперматозоидов; проницаемость мембран; эозин; пропидия йодид; микроскопия.

M.V. Ploskonos

### THE APPLICATION OF EOSIN AND PROPIDIUM IODIDE IN EVALUATION OF VITALITY OF HUMAN SPERMATOZOA

The Astrakhan state medical academy of Minzdrav of Russia, 414000 Astrakhan, Russia

*The article analyzes comparative assessment of vitality of spermatozoa by condition of permeability of membranes for eosin and propidium iodide and comparison of results acquired using technique of light and fluorescent microscopy. The comparison of data of light microscopy with eosin staining with data of fluorescent microscopy with propidium iodide staining demonstrated that percentage of content of spermatozoa separated from ejaculates of 28 fertile males and stained with eosin was reliably higher ( $34.8 \pm 3.2$ ) than percentage of content of spermatozoa with stained with propidium iodide ( $21.1 \pm 4.0$ ). After incubation of spermatozoa under room temperature during 24 hours percentage of unviable cells with stained eosin also was higher than in case of propidium iodide staining correspondingly ( $44.5 \pm 3.3\%$  and  $34.7 \pm 3.6\%$ ). The analysis of vitality of spermatozoa under damaging effect of oxidative stress on cell membrane developed by 4 hours incubation with 200 mкM of hydrogen peroxide ( $H_2O_2$ ) demonstrated that under staining of spermatozoa with propidium iodide significantly higher percentage of damaged cells is detected. In such cases, eosin staining is less suitable for detection of vitality of spermatozoa ( $73.6 \pm 5.8\%$  against  $51.7 \pm 6.4\%$ ). The carried out experiment demonstrates that in case of detected effects on spermatozoa (for example, effect of oxidative stress) the light microscopy insufficiently adequate reflects degree of damage of membranes of spermatozoa. The fluorescent microscopy detects a higher percentage of spermatozoa with damaged membrane.*

**Keywords:** vitality; spermatozoa; permeability of membranes; eosin; propidium iodide; microscopy

Методы оценки жизнеспособности сперматозоидов основаны на факте нарушения целостности наружной мембраны у клетки вскоре после ее гибели. Одним из критериев оценки качества эякулята, рекомендованных ВОЗ [1, 2], является подсчет доли (в %) жизнеспособных сперматозоидов, точнее, тех из них, клеточная мембрана которых непроницаема для витальных красителей, в частности для эозина (ЭО). Суправитальная окраска ЭО по Bloom используется для дифференциации живых и мертвых сперматозоидов. Краситель, добавленный к сперматозоидам, проникает в клетки с поврежденной мембраной и окрашивает их, живые клетки не окрашиваются, затем производится подсчет окрашенных клеток в общей популяции сперматозоидов с помощью световой микроскопии [3]. Оценка жизнеспособности может служить

контролем точности оценки подвижности сперматозоидов, поскольку процент мертвых клеток не должен превышать процента неподвижных сперматозоидов. В норме эякулят должен содержать не менее 50% подвижных сперматозоидов или не менее 25% с поступательным движением в течение 60 мин после эякуляции, а также 50% и более живых сперматозоидов, т. е. сперматозоидов, не окрашенных суправитальной окраской по Bloom [1, 2].

Для дифференциации живых и мертвых клеток также можно использовать флуоресцентные красители, проникающие в клетки. Одним из подобных красителей, который часто используют для данных целей, является йодистый пропидий (PI) [4, 5].

Как известно, часть сперматозоидов в процессе дифференцировки подвергается апоптозу, который на ранних стадиях характеризуется активацией эндонуклеаз, расщеплением ДНК, протеолитической деградацией ядерной оболочки, а на завершающей стадии процесса наблюдается нарушение проницаемости клеточной мембраны с последующей деструкцией клетки [6–8].

Одно из самых ранних биохимических изменений, происходящих в клетке, подвергшейся апоптозу, это нарушение

Для корреспонденции:

Плосконос Мария Вячеславовна, канд. биол. наук, проф., доцент каф. химии

Адрес: 414022, Астрахань, ул. Звездная, 41/1-8

E-mail: ploskonoz@mail.ru

симметрии клеточной мембраны и перемещение фосфатидилсерина (ФС) на внешнюю сторону плазматической мембраны (экстернализация) [9]. Детектировать экстернализацию ФС при апоптозе позволяет кальцийзависимый белок – аннексин V (AnV), способный специфически связываться с отрицательно заряженным ФС. Поскольку AnV может проникнуть в мертвые клетки через разрывы мембраны и окрасить внутренний слой мембраны, то используют дополнительное окрашивание сперматозоидов катионным красителем PI, который проникает только в погибшие клетки через поврежденную при некрозе мембрану. Используя комбинацию красителей AnV и PI с помощью флуоресцентной микроскопии можно дифференцировать живые, мертвые и апоптотические клетки на ранней и промежуточной стадиях апоптоза по клеточному циклу в популяции сперматозоидов [9, 10].

При инкубации сперматозоидов с обоими красителями жизнеспособные клетки не связывают AnV и непроницаемы для катионных красителей. При флуоресцентной микроскопии такие клетки идентифицируются как AnV-FITC отрицательные – PI отрицательные (AnV-/PI-). Потеря мембранной асимметрии в динамике развития апоптоза соответствует начальным этапам фрагментации ДНК и конденсации хроматина (ранний апоптоз) и предшествует потере проницаемости мембраны для катионных красителей. На этой стадии клетки, вступившие в апоптоз, связывают AnV, но, как и живые клетки, непроницаемы для катионных красителей. Эти клетки идентифицируются как AnV-FITC положительные – PI отрицательные (AnV+/PI-). Поздняя фаза апоптоза, формирование апоптотических телец, сопровождается не только формированием мембранной асимметрии, но и резким возрастанием проницаемости мембраны для катионных красителей. Клетки, находящиеся в позднем апоптозе, и частично некротические клетки идентифицируются как AnV-FITC положительные – PI положительные (AnV+/PI+). Мертвые сперматозоиды с поврежденной мембраной могут быть также AnV-FITC отрицательные – PI положительные (AnV-/PI+) [10, 11].

Цель работы – сравнительное определение жизнеспособности сперматозоидов по состоянию проницаемости мембран для ЭО и PI и сопоставление результатов методов световой и флуоресцентной микроскопии.

**Материалы и методы.** Образцы эякулятов были получены от 28 здоровых фертильных мужчин в возрасте от 21 года до 38 лет. Получение и исследование эякулятов, включая определение концентрации, подвижности и морфологии сперматозоидов, а также жизнеспособности сперматозоидов по состоянию проницаемости мембраны для ЭО осуществляли после разжижения эякулята согласно рекомендациям и нормативам ВОЗ [1, 2].

Часть эякулята смешивали (1:10) с фосфатно-солевым буфером (PBS; pH 7,4) и центрифугировали при 220 g в течение 10 мин. Семенную плазму удаляли, а осадок ресуспендировали в 1 мл среды Menezo B-2 (BioMerieux, Франция). Некоторое количество этой клеточной взвеси было разделено на равные части, которые были инкубированы в среде B-2 с 5% CO<sub>2</sub> при 37°C в течение 4 и 24 ч. С целью оказания повреждающего действия на мембрану был индуцирован окислительный стресс 4-часовой инкубацией сперматозоидов с 200 мкМ перекиси водорода (при 37°C, 5% CO<sub>2</sub>).

**Анализ подвижности.** Подвижность сперматозоидов оценивали с помощью счетной камеры Горяева. Часть образца

клеточной взвеси была помещена в камеру и наблюдалась под объективом ×40. Данную манипуляцию повторяли дважды. Каждый раз подсчитывали не менее 100 сперматозоидов.

**Суправитальная окраска ЭО на выявление жизнеспособности.** Чтобы оценить жизнеспособность сперматозоидов, использовали 3% водный раствор ЭО [3].

Образец эякулята центрифугировали при 220 g в течение 10 мин. Семенную плазму удаляли, а осадок ресуспендировали в 100 мкл PBS при температуре 37°C. 10 мкл полученной в результате ресуспендирования клеточной взвеси были смешаны на предметном стекле с 10 мкл ЭО. Через 1 мин был сделан мазок и высушен на воздухе. Дальнейшую оценку процента окрашенных сперматозоидов вели световой микроскопией под иммерсионным объективом (×100) с окуляром ×10 или бинокуляром. В каждом мазке были исследованы как минимум 200 сперматозоидов. Процент окрашенных сперматозоидов был оценен как процент нежизнеспособных сперматозоидов.

**Суправитальная окраска PI и оценка связывания с AnV на выявление апоптотических и некротических клеток.** Для исследования жизнеспособности половых клеток с помощью флуоресцентной микроскопии применяли метод, используемый для определения апоптоза клеток, предполагающий использование конъюгата AnV с флуорохромом (AnV-FITC) и PI [9, 10]. Отмытые сперматозоиды (1•10<sup>6</sup>) инкубировали в течение 10 мин в темноте при комнатной температуре с AnV-FITC и 20 мкл PI в 1 мл HEPES-буфера согласно инструкции изготовителя (Boehringer Mannheim, Германия). Суспензия клеток спермы была нанесена мазком на стеклянную пластинку и высушена на воздухе. Мазки исследовались на флуоресцентном микроскопе “МИКРОМЕД 3 ЛЮМ” (Санкт-Петербург) под иммерсионным объективом (×100). В каждом мазке были исследованы как минимум 500 сперматозоидов.

Сперматозоиды, окрашенные только PI (AnV-/PI+) или и PI и AnV (AnV+/PI+), оценивались как нежизнеспособные (мертвые) с поврежденной мембраной, а окрашенные только AnV (AnV+/PI-) – как апоптотические. Неокрашенные клетки (AnV-/PI-) оценивались как жизнеспособные.

Полученные результаты исследований обработаны с помощью пакета прикладных программ Statistica 7.0 (StatSoft Inc., 2004), EXCEL-2007 с учетом стандартных методик вариационной статистики, включая вычисление критерия *t* Стьюдента для оценки достоверности различий. Для каждой серии данных вычисляли среднее арифметическое (*M*), ошибку среднего (*m*). Данные представлены в виде *M*±*m*, различия между показателями считали достоверными при значении *p*<0,05.

**Результаты и обсуждение.** Сравнение результатов двух методов окрашивания (ЭО и PI) свежевыделенных сперматозоидов для выявления жизнеспособности половых клеток показало, что процентное содержание сперматозоидов, окрашенных ЭО, было достоверно выше (*p* < 0,05), чем процентное содержание сперматозоидов, окрашенных PI: процент нежизнеспособных сперматозоидов был равен 34,8 ± 3,2 и 21,1 ± 4,0% соответственно (см. таблицу). Процент нежизнеспособных сперматозоидов, окрашенных ЭО, после 4- и 24-часовой инкубации был также выше, чем при окрашивании PI, после тех же периодов инкубации. Это различие в окраске можно объяснить тем фактом, что первая окраска (ЭО) явля-

**Оценка жизнеспособности сперматозоидов по состоянию проницаемости мембран для ЭО и PI методами световой и флуоресцентной микроскопии (*M* ± *m*; *n* = 28)**

Метод оценки жизнеспособности сперматозоидов	% нежизнеспособных сперматозоидов			
	свежевыделенных	через 4 ч инкубации	через 24 ч инкубации	после 4 ч инкубации с H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>
Световая микроскопия (ЭО-положительные сперматозоиды)	34,8 ± 3,2	37,5 ± 4,2	44,5 ± 3,3	51,7 ± 6,4
Флуоресцентная микроскопия (PI-положительные сперматозоиды)	21,1 ± 4,0	27,7 ± 3,8	34,7 ± 3,6	73,6 ± 5,8

ется цитоплазматической, а вторая (PI) – ядерной. Суправитальное окрашивание цитоплазмы требует только проникновения красителя через плазматическую мембрану, тогда как для ядерного окрашивания краситель должен проникнуть через ядерную оболочку. Таким образом, нежизнеспособные сперматозоиды могут окраситься ЭО раньше, когда PI еще не может проникнуть к ядру.

Полученные данные отличаются от ранее представленных результатов В.В. Евдокимова и соавт. [12], которыми была предпринята попытка сравнения двух методов оценки жизнеспособности сперматозоидов – световой микроскопии с окраской ЭО и проточной цитометрии с окраской PI (метод, разработанный фирмой Molecular Probes, предполагающий использование двух флуорохромов: PI и сибра-14, испускающих свет в различных областях спектра и регистрируемых разными каналами). Авторы пришли к заключению, что при исследовании свежеполученной спермы оба метода дают аналогичные результаты и являются взаимозаменяемыми, что позволяет рекомендовать данные методы в рутинную практику клинической андрологической лаборатории. Несомненно, проточную цитометрию из-за высокой информативности, производительности, объективности показателей, статистической достоверности и доказательности результатов следует считать наиболее оптимальным и перспективным методом [10]. Однако не каждая лаборатория имеет такую техническую оснащенность и финансовую возможность проводить определение жизнеспособности клеток этим методом.

Подвижность сперматозоидов не изменялась в течение первых 4 ч инкубации, но после 24 часов инкубации процентное содержание неподвижных клеток увеличилось. Процентное содержание нежизнеспособных сперматозоидов также не изменялось в течение первых 4 ч, но после 24 ч инкубации *in vitro* происходило статистически значимое увеличение количества клеток, окрашенных как ЭО, так и PI (см. таблицу). Однако статистически значимого изменения процентного содержания AnV-положительных сперматозоидов (AnV+/PI-) в течение 24 ч инкубации *in vitro* не происходило.

Полученные данные указывают на то, что причиной клеточной гибели большинства эякуляторных сперматозоидов, которые теряли жизнеспособность в течение 24 ч инкубации, был некроз, а не апоптоз. Таким образом, экстернализация ФС, визуализированная по связыванию с AnV, является, скорее всего, следствием процессов, начатых до эякуляции, и смерть эякуляторных сперматозоидов фертильных мужчин, по крайней мере в условиях *in vitro*, осуществляется путем некроза, а не апоптоза. Поскольку некроз клеток спермы сопровождается потерей подвижности, не возникает существенного риска принять погибающий сперматозоид за жизнеспособный после продления периода инкубации *in vitro*. Следовательно, инкубация спермы *in vitro* до 24 ч вряд ли будет ставить под угрозу результаты вспомогательных репродуктивных технологий, например ICSI, по крайней мере, при использовании нормозооспемических образцов спермы.

Важным патогенетическим звеном при развитии мужской инфертильности является окислительный стресс (повышенный уровень активных форм кислорода (ROS или АФК) [13–15]. Сперматозоиды очень чувствительны к окислительному стрессу, так как они транскрипционно неактивны и имеют минимальное количество цитоплазмы, содержащей недостаток антиоксидантов и ДНК-восстанавливающих систем [16]. Под влиянием АФК в сперматозоидах активируется перекисное окисление липидов плазматической мембраны, богатой ненасыщенными жирными кислотами, нарушается ряд важнейших биохимических процессов и функционирование мембранных структур клеток и субклеточных образований, повреждается структура митохондриальной и геномной ДНК [17, 18]. АФК – известный индуктор апоптоза в соматических клетках [19] и в созревших сперматозоидах на тестикулярном уровне [20].

С целью изучения жизнеспособности сперматозоидов в результате повреждающего действия на мембрану клетки

окислительного стресса, создаваемого АФК, были предприняты опыты по инкубации сперматозоидов с  $H_2O_2$ . Уровень повреждения мембраны сперматозоидов определяли обоими методами (световой микроскопией с окраской ЭО и флуоресцентной микроскопией с окраской PI).

$H_2O_2$  стимулирует гибель клеток по пути как апоптоза, так и некроза. Направленность эффекта зависит не только от концентрации  $H_2O_2$ , функционального состояния клеток, но и от времени инкубации.

Как следует из полученных результатов, при окрашивании сперматозоидов PI выявляется существенно более высокий процент поврежденных клеток после их инкубации с  $H_2O_2$ , а ЭО в этих случаях менее пригоден для выявления жизнеспособности сперматозоидов (см. таблицу).

Уже после 5 мин инкубации с  $H_2O_2$  подвижность сперматозоидов была равна нулю. Признаки апоптоза проявлялись уже через 1 ч после добавления  $H_2O_2$ . Так, под влиянием  $H_2O_2$  доля клеток, связывающихся только с AnV, составляла более 50%. Количество сперматозоидов с поврежденной мембраной, окрашенных PI, стало более 30%. Только 16% сперматозоидов оставались жизнеспособными.

Четырехчасовая инкубация с  $H_2O_2$  способствовала увеличению количества некротических сперматозоидов и снижению доли AnV-положительных клеток. При этом процентное содержание сперматозоидов, окрашенных PI, было достоверно выше, чем процентное содержание сперматозоидов, окрашенных ЭО: процент определения нежизнеспособных сперматозоидов был равен  $73,6 \pm 5,8$  и  $51,7 \pm 6,4$  соответственно (см. таблицу).

Таким образом, инкубация с  $H_2O_2$  в зависимости от времени приводила сначала к переходу жизнеспособных клеток в клетки, связывающиеся с AnV, что указывает на нарушение симметрии клеточной мембраны и экстернализацию ФС [21], а затем происходит переход от AnV-положительных клеток к клеткам, окрашивающимся PI, что указывает на повреждение мембраны, т.е. потерю целостности.

Возможной причиной расхождения результатов оценки жизнеспособности сперматозоидов, окрашенных ЭО или PI, мог, по нашему мнению, явиться тот факт, что при длительном воздействии  $H_2O_2$  нежизнеспособные клетки – это в первую очередь сперматозоиды, претерпевающие не только некротическую гибель, но и находящиеся на поздней стадии апоптоза, которая сопровождается не только формированием мембранной асимметрии, но и резким возрастанием проницаемости мембраны для PI. В этом случае, вероятно, более чувствительным и предпочтительным является флуоресцентный метод.

**Заключение.** Таким образом, оба метода оценки жизнеспособности половых клеток – световая микроскопия с окраской ЭО и флуоресцентная микроскопия с окраской PI – могут успешно применяться в клинических лабораториях. Проведенное исследование показало, что для оценки жизнеспособности свежевыведенных половых клеток или клеток после 24-часового периода инкубации суправитальная окраска ЭО по Bloom является более пригодной в рутинной практике клинической андрологической лаборатории. Световая микроскопия в данном случае более адекватно отражает нарушение целостности наружной мембраны у клетки вскоре после ее гибели и проницаемость мембраны сперматозоидов для цитоплазматического красителя ЭО, а также является более доступным методом с точки зрения технической оснащенности и в значительной мере финансовых затрат лаборатории.

После определенных воздействий на сперматозоиды *in vitro* (например, воздействие  $H_2O_2$ ) флуоресцентная микроскопия выявляет достоверно более высокий процент сперматозоидов с поврежденной мембраной. Окраска ЭО недостаточно точно отражает уровень повреждения мембраны сперматозоидов при воздействии на клетку окислительного стресса и более пригодной в этом случае является окраска PI.

## ЛИТЕРАТУРА

1. WHO laboratory manual for the examination of human sperm and semen-cervical mucus interaction. 4th ed. Cambridge: University Press; 1999.
2. Курило Л.Ф., ред. *Руководство ВОЗ по лабораторному исследованию эякулята человека и взаимодействия сперматозоидов с цервикальной слизью*. 4-е изд. М.: «МедПресс»; 2001.
3. Долгов В.В., Луговская С.А., Фанченко Н.Д., Миронова И.И., Назарова Е.К., Ракова Н.Г. и др. *Лабораторная диагностика мужского бесплодия*. М.: Кафедра КЛД; 2006.
4. Tarozzi N., Bizzaro D., Flamigni C., Borini A. Clinical relevance of sperm DNA damage. *Reprod. Biomed.* 2007; 14 (6): 746-57.
5. Falzone N., Huysen C., Franken D.R. Comprason between propidium iodide and 7-amino-actinomycin-D for viability assessment during flow cytometric analyses of the human sperm acrosome. *Andrologia.* 2010; 42 (1): 20-6.
6. Комарова М.В. *Характеристика эякулята в оценке репродуктивных возможностей человека*: Автореф. дис. ... канд. биол. наук. Уфа; 2000.
7. Шеина Ю.И., Зайцева Т.А., Махалова Н.А., Новосельцева А.В., Маркова Е.В., Светлаков А.В. Анализ фрагментации ДНК в сперматозоидах с помощью окраски акридиновым оранжевым у пациентов с бесплодием. *Проблемы репродукции.* 2012; 5: 74-9.
8. Darzynkiewicz Z., Juan G., Li X., Gorczyca W., Murakami T., Traganos F. Cytometry in cell necrobiology: analysis of apoptosis and accidental cell death (necrosis). *Cytometry.* 1997; 27 (1): 1-20.
9. Glander H.-J., Schaller J. Binding of annexin V to plasma membranes of human spermatozoa: a rapid assay for detection of membrane changes after cryostorage. *Mol. Hum. Reprod.* 1999; 5 (2): 109-15.
10. Плосконос М.В. Методы определения апоптоза сперматозоидов (Обзор литературы). *Клиническая лабораторная диагностика.* 2013; 4: 3-8.
11. Данченко Е.О. Лабораторные методы оценки апоптоза и некроза. *Медицинская панорама (Лабораторная медицина).* 1999; 3: 18-9.
12. Евдокимов В.В., Харламова Л.А., Айбяттов Д.Т., Туровецкий В.Б., Ерохин А.С. Сопоставление методов и условий для качественной оценки сперматозоидов человека. *Проблемы репродукции.* 2012; 3: 68-71.
13. Gil-Guzman E., Ollero M., Lopez M.C., Sharma R.K., Alvarez J.G., Thomas A.J.Jr. et al. Differential production of reactive oxygen species by subsets of human spermatozoa at different staged of maturation. *Hum. Reprod.* 2001; 16 (9): 1922-30.
14. Sikka S.C. Relative impact of oxidative stress on male reproductive function. *Curr. Med. Chem.* 2001; 8 (7): 851-62.
15. Aitken R.J., Baker M.A., Sawyer D. Oxidative stress in the male germ line and its role in the etiology of male infertility and genetic disease. *Reprod. Biomed. Online.* 2003; 7: 65-70.
16. Olsen A.K., Lindeman B., Wiger R., Duale N., Brunborn G. How do male germ cells handle DNA damage? *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 2005; 207: 521-31.
17. Lopes S., Jurisicova A., Sun J.G., Casper R.F. Reactive oxygen species: potential cause for DNA fragmentation in human spermatozoa. *Hum. Reprod.* 1998; 13 (4): 896-900.
18. Agarwal A., Sharma R.K., Nallella K.P., Thomas A.J.Jr., Alvarez J.G., Sikka S.C. Reactive oxygen species as an independent marker of male factor infertility. *Fertil. Steril.* 2006; 86 (4): 878-85.
19. Ratan R.R., Murphy T.H., Baraban J.M. Oxidative stress induces apoptosis in embryonic cortical neurons. *J. Neurochem.* 1994; 62: 376-9.
20. Gorczyca W., Traganos E., Jesionowska H., Darzynkiewicz Z. Presence of DNA strand breaks and increased sensitivity of DNA in situ to denaturation in abnormal human sperm cells: analogy to apoptosis of somatic cells. *Exp. Cell Res.* 1993; 207: 202-5.
21. Плосконос М.В. Мембранная экстернализация фосфатидилсерина сперматозоидов фертильных и субфертильных мужчин. В кн.: *Материалы международной научно-практической конференции «Перспективы развития науки и образования»*. М.: «АР-Консалт»; 2013; ч. 1: 73-5.

## REFERENCES

1. WHO laboratory manual for the examination of human sperm and semen-cervical mucus interaction. 4th ed. Cambridge: University Press; 1999.
2. Kurilo L.F., ed. *WHO guidelines for laboratory research of ejaculate rights and interaction of sperm cells from the cervical mucus.* 4th ed. Moscow: Izd-vo "MedPress"; 2001. (in Russian)
3. Dolgov V.V., Lugovskaya S.A., Fanchenko N.D., Mironova I.I., Nazarova E.K., Rakova N.G. et al. *Laboratory diagnosis of male infertility [Laboratornaya diagnostika muzhskogo besplodiya]*. Moscow: Kafedra KLD; 2006. (in Russian)
4. Tarozzi N., Bizzaro D., Flamigni C., Borini A. Clinical relevance of sperm DNA damage. *Reprod. Biomed.* 2007; 14 (6): 746-57.
5. Falzone N., Huysen C., Franken D.R. Comprason between propidium iodide and 7-amino-actinomycin-D for viability assessment during flow cytometric analyses of the human sperm acrosome. *Andrologia.* 2010; 42 (1): 20-6.
6. Komarova M.V. *Characteristic of ejaculate in assessing reproductive human capabilities.* Diss. Ufa; 2000. (in Russian)
7. Sheina Yu.I., Zaytseva T.A., Makhhalova N.A., Novosel'tseva A.V., Markova E.V., Svetlakov A.V. Analysis of DNA fragmentation in sperm, using coloring acridine orange in patients with infertility. *Problemy reproduksii.* 2012; 5: 74-9. (in Russian)
8. Darzynkiewicz Z., Juan G., Li X., Gorczyca W., Murakami T., Traganos F. Cytometry in cell necrobiology: analysis of apoptosis and accidental cell death (necrosis). *Cytometry.* 1997; 27 (1): 1-20.
9. Glander H.-J., Schaller J. Binding of annexin V to plasma membranes of human spermatozoa: a rapid assay for detection of membrane changes after cryostorage. *Mol. Hum. Reprod.* 1999; 5 (2): 109-15.
10. Ploskonos M.V. Methods for determination of sperm apoptosis (Literature review). *Klinicheskaya laboratornaya diagnostika.* 2013; 4: 3-8. (in Russian)
11. Danchenko E.O. Laboratory methods of estimation of apoptosis and necrosis. *Meditsinskaya panorama (Laboratornaya meditsina).* 1999; 3: 18-9. (in Russian)
12. Evdokimov V.V., Harlamova L.A., Ajbhatov D.T., Turoveckij V.B., Erohin A.S. A comparison of the methods and conditions for the qualitative assessment of the sperm of a man. *Problemy reproduksii.* 2012; 3: 68-71. (in Russian)
13. Gil-Guzman E., Ollero M., Lopez M.C., Sharma R.K., Alvarez J.G., Thomas A.J.Jr. et al. Differential production of reactive oxygen species by subsets of human spermatozoa at different staged of maturation. *Hum. Reprod.* 2001; 16 (9): 1922-30.
14. Sikka S.C. Relative impact of oxidative stress on male reproductive function. *Curr. Med. Chem.* 2001; 8 (7): 851-62.
15. Aitken R.J., Baker M.A., Sawyer D. Oxidative stress in the male germ line and its role in the etiology of male infertility and genetic disease. *Reprod. Biomed. Online.* 2003; 7: 65-70.
16. Olsen A.K., Lindeman B., Wiger R., Duale N., Brunborn G. How do male germ cells handle DNA damage? *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 2005; 207: 521-31.
17. Lopes S., Jurisicova A., Sun J.G., Casper R.F. Reactive oxygen species: potential cause for DNA fragmentation in human spermatozoa. *Hum. Reprod.* 1998; 13 (4): 896-900.
18. Agarwal A., Sharma R.K., Nallella K.P., Thomas A.J.Jr., Alvarez J.G., Sikka S.C. Reactive oxygen species as an independent marker of male factor infertility. *Fertil. Steril.* 2006; 86 (4): 878-85.
19. Ratan R.R., Murphy T.H., Baraban J.M. Oxidative stress induces apoptosis in embryonic cortical neurons. *J. Neurochem.* 1994; 62: 376-9.
20. Gorczyca W., Traganos E., Jesionowska H., Darzynkiewicz Z. Presence of DNA strand breaks and increased sensitivity of DNA in situ to denaturation in abnormal human sperm cells: analogy to apoptosis of somatic cells. *Exp. Cell Res.* 1993; 207: 202-5.
21. Ploskonos M.V. Membrane externalisation phosphatidylserine sperm fertile and be subfertile men. In: *Materials of the International scientifically-practical conference "Prospects of development of science and education"*. Moscow: "AR-Konsalt"; 2013; ch. 1: 73-5.

Поступила 10.04.14  
Received 10.04.14