

ЦИТОЛОГИЯ

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2021

Тарлычева А.А., Маркова Ж.Г., Юрченко Д.А., Шилова Н.В.

ОПТИМИЗАЦИЯ ПРОТОКОЛА ОБРАБОТКИ ПРЕПАРАТОВ ЭЯКУЛЯТА ДЛЯ ПОСЛЕДУЮЩЕГО МОЛЕКУЛЯРНО-ЦИТОГЕНЕТИЧЕСКОГО ИССЛЕДОВАНИЯ

ФГБНУ «Медико-генетический научный центр имени академика Н.П. Бочкова», 115522, г. Москва, Россия

Одной из причин спонтанного прерывания беременности, бесплодия, рождения детей с нарушениями и пороками развития являются хромосомные аномалии (ХА), а также спонтанные анеуплоидии в гаметах у фенотипически нормальных родителей. Зачастую супружеские пары с репродуктивными проблемами, а также супруги, один из которых является носителем ХА, прибегают к использованию программ вспомогательных репродуктивных технологий (ВРТ) для преимплантационной оценки хромосомного статуса зигот. Зачастую для оценки уровня спонтанной анеуплоидии в рамках программ ВРТ проводят исследование родительских гамет. Как правило, наиболее доступным для анализа материалом являются клетки эякулята. Для исследования полученных из эякулята препаратов гамет мужчин, используют метод флуоресцентной in situ гибридизации (FISH). Однако такой FISH-анализ сопряжен с рядом ограничений и трудностей из-за особенностей строения головки сперматозоидов, а именно сверхконденсированного состояния хроматина хромосом. Для повышения качества анализа и эффективности гибридизации необходимо проводить предгибридизационную обработку препаратов. С целью оптимизации протокола FISH были использованы пять различных протоколов предгибридизационной обработки препаратов эякулята, полученного от девяти фенотипически нормальных мужчин. В результате проведенного сравнительного анализа эффективности гибридизации показано, что наиболее эффективным для последующего молекулярно-цитогенетического исследования является протокол с использованием трис(2-карбоксетил) фосфингидрохлорида (ТСЕР) в качестве деконденсирующего агента. Разработанный гибридный протокол, сочетающий протеолитическую предобработку, длительное инкубирование в растворе 2xSSC, ТСЕР и тепловую деконденсацию может быть использован в случаях, когда другие протоколы предгибридизационной обработки препаратов эякулята не эффективны.

Ключевые слова: ТСЕР; DTT; FISH сперматозоидов; анеуплоидия.

Для цитирования: Тарлычева А.А., Маркова Ж.Г., Юрченко Д.А., Шилова Н.В. Оптимизация протокола обработки препаратов эякулята для последующего молекулярно-цитогенетического исследования. *Клиническая лабораторная диагностика.* 2021; 66 (10): 603-609. DOI: <https://dx.doi.org/10.51620/0869-2084-2021-66-10-603-609>

Для корреспонденции: Тарлычева Анастасия Александровна, мл. науч. сотр. лаб. цитогенетики, e-mail: atarlycheva@yandex.ru

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов

Финансирование. Работа проведена в рамках темы НИР №115013070082 «Структурная организация генома при редких хромосомных аномалиях».

Поступила 10.06.2021

Принята к печати 20.07.2021

Tarlycheva A.A., Markova Zh.G., Yurchenko D.A., Shilova N.V.

OPTIMIZATION OF THE SPERM PROCESSING PROTOCOL FOR SUBSEQUENT MOLECULAR CYTOGENETIC STUDIES

Research Centre for Medical Genetics, 115522, Moscow, Russian Federation

One of the causes of spontaneous pregnancy termination, infertility, and birth of children with development delay and malformations are chromosomal abnormalities (CA) as well as spontaneous aneuploidies in gametes of phenotypically normal parents. Often couples with reproductive problems, as well as spouses one of whom is a carrier of CA, turn to the programs of assisted reproductive technologies (ART) for preimplantation evaluation of the zygote chromosomal status. As part of ART programs, parental gametes are examined to assess the level of spontaneous aneuploidy. As a rule, the most accessible material for analysis is the ejaculate. Fluorescent in situ hybridization (FISH) is used to examine male gametes obtained from the ejaculate. However, this FISH-analysis has a number of limitations and difficulties because of the peculiarities of the sperm head structure, namely the supercondensed state of chromosome chromatin. In order to optimize the FISH protocol, five different protocols were used for pre-hybridization processing of ejaculate samples obtained from nine phenotypically normal men. A comparative analysis of hybridization efficiency showed that the protocol using tris(2-carboxyethyl)phosphine hydrochloride (TCEP) as a decondensation agent was the most effective for subsequent molecular cytogenetic studies. The developed hybrid protocol combining proteolytic pretreatment, TCEP and thermal decondensation can be used when other protocols for pre-hybridization treatment of ejaculate preparations are not effective.

Key words: TCEP; DTT; sperm FISH; aneuploidy.

For citation: Tarlycheva A.A., Markova Zh.G., Yurchenko D.A., Shilova N.V. Optimization of the sperm processing protocol for subsequent molecular cytogenetic studies. *Klinicheskaya Laboratornaya Diagnostika (Russian Clinical Laboratory Diagnostics).* 2021; 66 (10): 603-609 (in Russ.) DOI: <https://dx.doi.org/10.51620/0869-2084-2021-66-10-603-609>

For correspondence: Tarlycheva Anastasiya Aleksandrovna, junior researcher of the Laboratory of Cytogenetics;
e-mail: atarlycheva@yandex.ru

Information about authors:

Tarlycheva A.A., <https://orcid.org/0000-0002-9560-0273>;
Markova Zh.G., <https://orcid.org/0000-0003-2941-2861>;
Yurchenko D.A., <https://orcid.org/0000-0002-5934-5551>;
Shilova N.V., <https://orcid.org/0000-0002-0641-1084>.

Conflict of interest. The authors declare no conflict of interest.

Acknowledgment. The reported study was funded by research work №115013070082 “Structural organization of the genome with rare chromosomal abnormalities”

Received 10.06.2021

Accepted 20.07.2021

Введение. Нарушение фертильности является глобальной проблемой, которая затрагивает около 15% супружеских пар и, согласно статистике, примерно в 50% случаев причиной бесплодия является нарушение фертильности у мужчин [1-3]. Снижение мужской фертильности может быть результатом врожденных и приобретенных аномалий мочеполовой системы, инфекций, повышенной температуры мошонки, эндокринных нарушений, иммунологических и генетических факторов [1, 4]. Генетическими причинами бесплодия и репродуктивных проблем являются сбалансированные ХА, а также спонтанные анеуплоидии в гаметех, возникшие *de novo* [5, 6]. Анеуплоидии, т.е. нарушение числа отдельных хромосом в виде наличия дополнительной гомологичной хромосомы (трисомия) или отсутствия одной из гомологичных хромосом (моносомия), являются наиболее частыми ХА у доимплантационных эмбрионов [7, 8]. Основными механизмами формирования клеток с анеуплоидией является хромосомное нерасхождение или анафазное отставание хромосом в родительском мейозе [8 – 10]. Возникновение одной из этих ошибок в гаметах родителей может привести к формированию зиготы как с моносомией, так и с трисомией, что, в свою очередь, может привести к спонтанному прерыванию беременности или к рождению ребёнка с хромосомной патологией. Вероятность возникновения гамет с хромосомным дисбалансом увеличивается также в случае родительского носительства сбалансированных ХА [11]. Кроме того, показано, что при носительстве ХА наблюдается так называемый межхромосомный эффект, т.е. повышенный уровень спонтанной анеуплоидии по хромосомам, не вовлеченным в ХА, что определяет важность и целесообразность проведения молекулярно-цитогенетического исследования гамет при использовании программ ВРТ у пациентов с бесплодием и/или репродуктивными проблемами [12, 13].

В 40-60% случаев снижения мужской фертильности единственным этиологическим фактором являются аномалии морфологии сперматозоидов и качество спермы: олигозооспермия, астенозооспермия и тератозооспермия. Обычно эти аномалии объединяются и описываются как ОАТ-синдром (олигоастенотератозооспермия). При этом известно, что у пациентов с нарушениями сперматогенеза достоверно значимо повышаются средние значения частоты анеуплоидии в сперматозоидах в сравнении с мужчинами с нормальными показателями спермограммы [14–16]. Так, например, у пациентов с олигозооспермией отмечается статистически значимое повышение доли клеток

с анеуплоидией по хромосоме 21, составляющей в среднем 1,3%, а также повышение уровня дисомии по половым хромосомам – в среднем 1,4% в сравнении с 0,8% и 0,6%, соответственно, у пациентов с нормоспермией [14].

Для оценки частоты возникновения аномальных клеток, как правило, используют метод флуоресцентной *in situ* гибридизации (FISH) [17-19]. Это исследование показано мужчинам с носительством структурных хромосомных перестроек и мужчинам, у которых в браке регистрировались повторные случаи невынашивания беременности у супруги [1,20]. FISH-анализ позволяет получать не только достоверные значения частот встречаемости гамет с различными вариантами патологической мейотической сегрегации ХА, но и позволяет оценить уровень спонтанной анеуплоидии у носителя хромосомной перестройки. Применение этого молекулярно-цитогенетического метода исследования сделало возможным анализ большого количества клеток и проведение гибридизации на любых свежеприготовленных препаратах сперматозоидов. Однако, несмотря на перечисленные достоинства FISH-метода, были обнаружены и некоторые его ограничения. Так, на достоверность получаемых результатов анализа влияет степень эффективности гибридизации. Максимальная, близкая к 100%, эффективность гибридизации достигается при оптимальной подготовке препаратов сперматозоидов к проведению FISH, позволяющей ДНК-зонду комплементарно взаимодействовать с ДНК-мишенью. В течение сперматогенеза замещение гистонов протаминами приводит к сверхплотной конденсированной хроматине [21]. Хроматин сперматозоидов локализован в ядре, которое занимает большую часть головки, при этом он примерно в 10 раз превышает плотность хроматина соматических клеток, что может существенно повлиять на проведение FISH-исследования [22-25]. Качество анализа и эффективность гибридизации в труднопроницаемом, сверхплотном конденсированном хроматине головок сперматозоидов значительно повышается за счет обработки препарата эякулята различными реагентами, которые позволяют ремоделировать хроматин, обеспечивая возможность проникновения ДНК-зонда к ДНК-мишени, сохраняя при этом важные морфологические особенности клеток. Ремоделирование ядер сперматозоидов подразумевает восстановление дисульфидных связей (S-S) и замещения протаминов гистонами [26, 27].

Широкое распространение получила предварительная обработка препаратов сперматозоидов с ис-

пользованием окислительно-восстановительного агента дитиотреитола (ДТТ), который восстанавливает дисульфидные связи в ядрах сперматозоидов, что приводит к искусственной деконденсации *in vitro* сперматозоидов млекопитающих [28-30]. Однако применение этого реагента в качестве деконденсанта хроматина сопряжено с определенными трудностями и ограничениями. Оптимизация протокола деконденсации хроматина сперматозоидов является первоочередной задачей в исследовании мейотической сегрегации хромосом в сперматогенезе.

Материал и методы. Было проведено молекулярно-цитогенетическое исследование препаратов из эякулята 9 фенотипически нормальных мужчин. FISH проводили с использованием локус-специфичных ДНК зондов на хромосомы 13 и 21 – PN 13(13q14) / 21(21q22), меченых флуорохромами SpectrumGreen и SpectrumOrange, соответственно, по протоколу производителя (Kreatech, Нидерланды). В каждом случае было проанализировано не менее 3000 клеток. Анализ осуществляли на эпифлуоресцентном микроскопе «AxioImager M.1» (CarlZeiss, Германия) с соответствующим набором светофильтров и использованием компьютерной программы обработки цифровых изображений «Isis» (MetaSystems, Германия). Полученные данные обрабатывали в программе Excel из пакета программ Microsoft Office 2007.

С целью разработки оптимального протокола для последующего исследования мейотической сегрегации сперматозоидов, был проведен сравнительный анализ препаратов из эякулята без деконденсации хроматина сперматозоидов, с тепловой деконденсацией хроматина, деконденсированных препаратов с использованием дитиотреитола (ДТТ) и деконденсированных препаратов с использованием трис(2-карбоксиитил)фосфингидрохлорида (tris(2-carboxyethyl)phosphine – TCEP), а также препаратов, деконденсированных по гибриднему протоколу, разработанному в нашей лаборатории для работы с образцами с низкой эффективностью гибридизации при использовании других протоколов деконденсации хроматина сперматозоидов.

Методика приготовления препаратов из эякулята для FISH-анализа. Образец эякулята инкубировали при 37°C в течение 30 мин с последующим разведением в натрий-фосфатном буфере (phosphate buffered saline – PBS) в соотношении 1:9. Центрифугировали 7 мин при 1850g. Элиминировали надосадочную жидкость, добавляли охлажденный фиксатор Карнуа (метанол/ледяная уксусная кислота в соотношении 3:1). Зафиксированную взвесь помещали на 60 мин на -20°C. Фиксатор меняли дважды, суспензию раскапывали на охлажденные влажные стекла.

Протоколы молекулярно-цитогенетического исследования

Протокол тепловой деконденсации хроматина сперматозоидов. Тепловую деконденсацию проводили в соответствии с ранее описанным протоколом [31]. На препаратах эякулята, приготовленных для FISH, денатурацию проводили при +90°C 10 минут, последующую гибридизацию в течение ночи проводили при +42°C.

Протокол деконденсации хроматина сперматозоидов с использованием ДТТ. Препараты, приготовленные для FISH, помещали в 5 мМ раствор ДТТ (Helicon) в 0.1M Tris и 1% Triton-X на 5-7 мин при +37°C, после

чего промывали в растворе 2xSSC 3 мин и дегидратировали в серии спиртов возрастающей концентрации по 1 минуте. Наносили на стекло 3,7% раствор формальдегида в PBS на 10 мин, промывали в растворе PBS 3 мин и дегидратировали в серии спиртов восходящей концентрации по 1 минуте.

Денатурацию проводили при 77°C, 7 мин с последующей гибридизацией в течение ночи при +37°C.

Протокол деконденсации хроматина сперматозоидов с использованием раствора TCEP. Препараты, приготовленные для FISH, помещали в раствор 2xSSC на 10-20 мин, на стекло наносили 13 мМ раствор TCEP (Applichem) на 3 мин, промывали в растворе 2xSSC 5 мин, наносили на стекло раствор 1% формалина в PBS на 3,5 минут. Препараты инкубировали в растворе 2xSSC 5 мин, после чего дегидратировали в серии спиртов восходящей концентрации по 1 минуте и сушили на воздухе.

Денатурацию проводили при 77°C, 7 мин с последующей гибридизацией в течение ночи при +37°C.

Гибридный протокол деконденсации хроматина сперматозоидов с использованием раствора пепсина и TCEP. Препараты помещали в 4% формальдегида 10 минут, после чего отмывали в PBS дважды по 5 минут. Подготовленные таким образом препараты инкубировали в 0,3% растворе пепсина в течение 20 мин при 37°C, после чего отмывали в PBS дважды по 5 мин, дегидратировали в серии спиртов восходящей концентрации по 1 мин и сушили на воздухе. Затем препараты инкубировали в растворе 2xSSC в течение 20 мин при +37°C, после чего на стекло наносили 13 мМ раствор TCEP на 3 мин, промывали в 2xSSC 5 мин, наносили на стекло 1% раствор формалина в PBS на 3,5 минут. Препараты инкубировали в растворе 2xSSC в течение 5 мин, после чего дегидратировали в серии спиртов восходящей концентрации по 1 мин и сушили на воздухе.

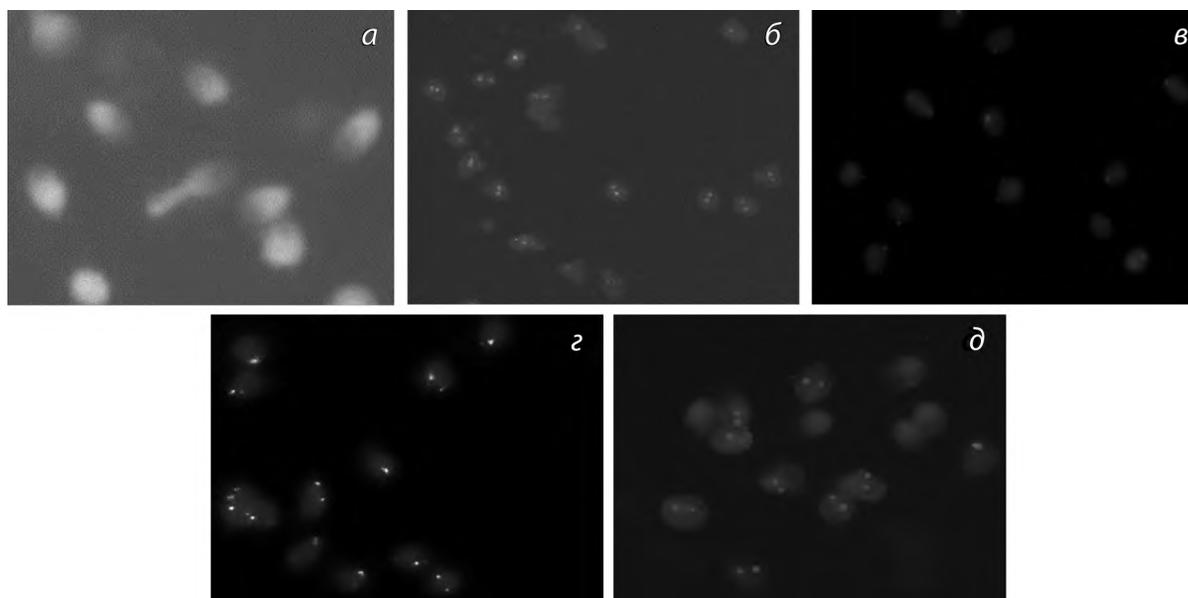
Денатурацию проводили при +90°C, 10 мин с последующей гибридизацией в течение ночи при +42°C.

Результаты. Был проведен FISH-анализ препаратов эякулята, полученного от 9 фенотипически нормальных мужчин, и подготовленных для FISH с использованием различных протоколов предобработки. Для выявления оптимального протокола использовали такие критерии как оценка эффективности гибридизации с локус-специфическими ДНК-зондами на хромосомы 13 и 21, т.е. определение частоты клеток с гибридизационными сигналами, а также соотношение «шум/сигнал», который определяли как отношение фоновой гибридизации к интенсивности гибридизационного сигнала.

Результаты сравнительной оценки различных протоколов предобработки клеток эякулята представлены в табл. 1 и на рисунке. Всего было проанализировано 79 488 клеток.

Обсуждение. Эффективность гибридизации, т.е., процент клеток с гибридизационными сигналами, на препаратах эякулята без деконденсации была самой низкой и в среднем составляла 23%. Фоновая гибридизация («шум») была высокой, а обнаруженные сигналы слабые (см. рисунок, а). Низкая эффективность гибридизации, преобладание фоновой гибридизации не позволили ни в одном случае провести корректный подсчет гибридизационных сигналов.

В препаратах, которые были подвергнуты тепловой деконденсации, эффективность гибридизации ва-



Результаты проведения молекулярно-цитогенетического исследования FISH с локус-специфичными ДНК-зондами на хромосомы 13 и 21. *а* – без обработки; *б* – тепловая обработка; *в* – протокол с использованием ДТТ; *г* – протокол с использованием ТСЕР; *д* – гибридный протокол.

Таблица 1

Эффективность гибридизации в клетках эякулята при использовании различных протоколов деконденсации хроматина ядра сперматозоидов

| Показатели | Эффективность гибридизации (%) \pm SD | «Шум»/сигнал | Всего проанализировано клеток |
|--------------------|---|--------------|-------------------------------|
| Без деконденсации | 23,1 \pm 2,2 | +/- | 18751 |
| Тепловая обработка | 78,8 \pm 8,2 | +/+ | 13246 |
| ДТТ | 73,8 \pm 1,2 | -/+ | 16346 |
| ТСЕР | 93,4 \pm 1,5 | -/+ | 15467 |
| Гибридный протокол | 67,8 \pm 9,7 | +/+ | 15678 |

Примечание. \pm SD – стандартное отклонение; + - наличие шума/сигнала; — - отсутствие шума/сигнала.

рыривала от 70 до 90%, составляя в среднем 78,8%. Такая обработка позволяет полностью сохранить морфологические особенности сперматозоидов и отличается быстротой выполнения процедуры. Однако данный протокол чувствителен как к качеству фиксации эякулята (недостаточное время фиксации, недостаточно низкая температура фиксатора, много белковой составляющей во взвеси), так и к качеству используемых предметных и покровных стёкол, что затрудняет воспроизводимость методики. Высокая интенсивность фоновой гибридизации, нестабильность тепловой обработки в целом определяют целесообразность использования тепловой деконденсации хроматина только в случаях, когда при анализе необходимо полностью сохранить морфологию сперматозоидов (см. рисунок, *б*).

Эффективность гибридизации в клетках, которые были деконденсированы с использованием ДТТ варьировала от 70 до 98%, составляя в среднем 73,8%. Наличие ярких дискретных гибридных сигналов обеспечило возможность корректного подсчета

количества гибридных сигналов как для хромосомы 13, так и для хромосомы 21 (см. рисунок, *в*). Протокол с использованием ДТТ в качестве деконденсированного агента является стандартным и общепринятым для обработки препаратов сперматозоидов [15, 31, 32]. Однако работа с раствором ДТТ должна проводиться с тщательным соблюдением условий личной безопасности, поскольку этот реагент является крайне летучим и токсичным веществом. Готовый раствор нестабилен, приготавливается *ex tempore* и требует замены не позднее, чем через три часа после приготовления рабочего раствора. Использование в рабочем протоколе дитиотреитола требует наличия вытяжного шкафа и термостата или водяной бани, а также контроля кислотности раствора, поскольку оптимальный pH для дитиотреитола составляет 7,1-8,0. Существенным недостатком является то, что в результате обработки ДТТ клетки могут изменить свою морфологию. Для анализа сегрегации хромосом более значимым является высокая эффективность гибридизации (ниже 85%) и низкий уровень фоновой гибридизации, одна-

Сравнительная оценка различных протоколов деконденсации сперматозоидов человека.

| Показатели | Преимущества протокола | Недостатки протокола |
|------------------------|--|---|
| Без деконденсации | - | Низкое качество сигналов Низкая эффективность гибридизации Фоновая гибридизация |
| Тепловая деконденсация | Простота выполнения Скорость выполнения Сохранность морфологии клеток | Невысокая эффективность гибридизации Чувствительность к качеству используемых материалов Фоновая гибридизация |
| ДТТ | Дискретность гибридизационных сигналов Отсутствие фоновой гибридизации | Невысокая эффективность гибридизации Токсичность реактива Узкий диапазон рабочего pH=7.1-8.0 Необходимость изготовления <i>ex tempore</i> Нарушение морфологии клеток |
| ТСЕР | Высокая эффективность гибридизации Отсутствие фоновой гибридизации Широкий диапазон рабочего pH=1.5-9.0 Высокое качество сигналов Возможность долгого хранения рабочего раствора при температуре -20°C | Не отмечено |
| Гибридный протокол | Позволяет провести анализ в случаях, когда ни один другой протокол не эффективен | Фоновая гибридизация Длительность выполнения Нарушение морфологии клеток |

ко при проведении исследований, требующих сохранности морфологии клеток, более предпочтительным протоколом предобработки может являться тепловая деконденсация с хотя и более высокой фоновой гибридизацией, но меньшими изменениями клеточной морфологии [28].

Самая высокая эффективность гибридизации была отмечена в препаратах сперматозоидов, которые были деконденсированы с использованием ТСЕР, где она в среднем составила 93,4% с диапазоном от 89,5 до 98% при практическом отсутствии фоновой гибридизации (см. рисунок, *з*). Достоинствами данного протокола является техническая простота его применения, возможность хранения готового раствора в течение длительного времени при температуре -20°C с сохранением стабильности. Показано, что ТСЕР эффективно восстанавливает дисульфидные связи в широком диапазоне pH (1,5-8,5) [33,34]. Единственным условным недостатком данного протокола является более высокая, в 2 раза выше, стоимость трис (2-карбоксиил) фосфингидрохлорида в сравнении дитиотреитолом [30].

В одном из девяти случаев эффективность гибридизации не превысила 5% при использовании протоколов, описанных выше. С целью повышения эффективности гибридизации, нами был разработан гибридный протокол денатурации хроматина сперматозоидов, сочетающий протеолитическую обработку с использованием раствора пепсина, отмывку в растворе 2xSSC и последующую деконденсацию с ТСЕР. При эффективности гибридизации в клетках препаратов при использовании гибридного протокола варьировала от 50 до 70% и в среднем составляла 67,8%. Следует отметить, что использование пепсина в качестве протеолитического агента позволило несколько улучшить соотношение «шум»/сигнал, однако привело к изменению морфологии сперматозоидов (см. рисунок, *д*).

Тем не менее несмотря на то, что это самый длительный по времени выполнения протокол из всех представленных с низкой эффективностью гибридизации и возможным нарушением морфологии клеток, его использование позволяет провести анализ даже в тех случаях, когда эффективность гибридизации составляет менее 5%. Таким образом, гибридный протокол может стать единственным, благодаря которому возможно провести анализ без необходимости повторного сбора материала.

Таким образом, эффективность гибридизации при использовании протокола с ТСЕР статистически значимо ($p < 0,05$) превышала таковую при всех прочих протоколах деконденсации хроматина, что позволяет считать ТСЕР оптимальным для ремоделирования хроматина ядер сперматозоидов в целях дальнейшего молекулярно-цитогенетического исследования мужских гамет.

В табл. 2 суммированы преимущества и недостатки всех рассмотренных протоколов деконденсации хроматина сперматозоидов.

Заключение. С развитием молекулярно-цитогенетических методов исследования, таких как флуоресцентная *in situ* гибридизация (FISH), стало возможным исследовать мейотическую сегрегацию хромосом в препаратах эякулята. Однако, в отличие от диффузного хроматина соматических клеток, особенности конденсации хроматина в сперматозоидах требуют оптимизации протоколов пробоподготовки к проведению FISH. Общепринятым и широко используемым в различных лабораториях деконденсирующим реагентом является дитиотреитол (ДТТ). Учитывая вышеописанные негативные свойства ДТТ, в целях оптимизации протокола пробоподготовки препаратов сперматозоидов человека для FISH-исследования мы использовали деконденсирующий реагент трис(2-карбоксиил)фосфингидрохлорид (ТСЕР). При применении такого протокола

CYTOLOGY

деконденсации хроматина сперматозоидов была отмечена максимальная эффективность гибридизации при наибольшей сохранности морфологии сперматозоидов и оптимальном соотношении «шум»/сигнал. Предложенный гибридный протокол предгибридизационной подготовки сперматозоидов, сочетающий деконденсацию хроматина с его протеолизом, позволяет проводить FISH-анализ в тех случаях, когда клетки эякулята нечувствительны к более щадящим протоколам деконденсации.

ЛИТЕРАТУРА (пп. 1-7, 9-13, 15-22, 26-35
см. REFERENCES)

8. Лебедев ИН, Никитина ТВ. На пути от цитогенетики к цитогеномике ранних репродуктивных потерь. *Молекулярно-биологические технологии в медицинской практике*. Новосибирск, 2014; 21: 3-84.
14. Тарлычева А.А., Маркова Ж.Г., Сорокина Т.М., Черных В.Б., Шилова Н.В. Частота анеуплоидии в сперматозоидах у мужчин с нарушением фертильности. *Медицинская генетика*. 2020; 19(3): 89-90. doi:10.25557/2073-7998.2020.03.89-90.
23. Брагина Е.Е., Арифупин Е.А., Лазарева Е.М., Лелекова М.А., Коломиец О.Л., Чоговадзе А.Г. и др. Нарушение конденсации хроматина сперматозоидов и фрагментация днк сперматозоидов: есть ли корреляция? *Андрология и генитальная хирургия*. 2017; 18(1): 48-61. doi:10.17650/2070-9781-2017-18-1-48-61.
24. Арифупин Е.А., Брагина Е.Е., Замятнина В.А., Волкова Е.Г., Шеваль Е.В., Голышев С.А. и др. Компактизация ДНК в сперматогенезе человека. I. Динамика компактизации нуклеогистонного и нуклеопротаминного хроматина в дифференцирующихся сперматидях. *Онтогенез*. 2012; 43(2): 143-53.
25. Брагина Е.Е., Замятнина В.А., Боcharова Е.Н., Шилейко Л.В., Курило Л.Ф., Гусак Ю.К. Количественное ультраструктурное исследование хроматина сперматозоидов при нарушении фертильности. *Андрология и генитальная хирургия*. 2009; 1: 44-9. doi:10.17650/2070-9781-2014-1-41-50.

REFERENCES

1. Dohle G.R., Colpi G.M., Hargreave T.B., Papp G.K., Jungwirth A., Weidner W. EAU guidelines on male infertility. *Eur. Urol.* 2015; 48(5): 703-11. doi:10.1016/j.eururo.2005.06.002.
2. Anton E., Vidal F., Blanco J. Role of sperm FISH studies in the genetic reproductive advice of structural reorganization carriers. *Human Reproduction*. 2007; 22(8): 2088-92. Doi:10.1093/humrep/dem152.
3. Borghet M.V., Wyns C. Fertility and infertility: Definition and epidemiology. *Clinical Biochemistry*. 2018; 62:2-10. doi:10.1016/j.clinbiochem.2018.03.012.
4. Rowe P.J., Comhaire F.H., Hargreave T.B., Mellows H.J. WHO manual for the standardised investigation and diagnosis of the infertile couple. *Cambridge University Press*; 1993.
5. Mau-Holzmann U.A. Somatic chromosomal abnormalities in infertile men and women. *Cytogenet. Genome Res.* 2005; 111:317-336. doi:10.1159/000086906.
6. Donker R.B., Vloerberghs V., Groen H., Tournaye H., C.M.A. van Ravenswaaij-Arts, Land J.A. Chromosomal abnormalities in 1663 infertile men with azoospermia: the clinical consequences. *Human Reproduction*. 2017; 32(12): 2574-80. doi:10.1093/humrep/dex307.
7. Hassold T., Hunt P. To err (meiotically) is human: the genesis of human aneuploidy. *Nat Rev Genet.* 2001; 2:280-291. doi:10.1038/35066065.
8. Lebedev I.N., Nikitina T.V. On the way from cytogenetics to cytogenomics of early reproductive loss. *Molecular biological tech-*

- nologies in medical practice [*Molekulyarno-biologicheskie tekhnologii v meditsinskoj praktike*]. Novosibirsk. 2014; 21: 3-84. (in Russian)
9. Garcia-Mengual E, Triviño, Sáez-Cuevas J.C., Bataller A., Ruiz-Jorro J., M. Vendrell X. Male infertility: establishing sperm aneuploidy thresholds in the laboratory. *Journal of Assisted Reproduction and Genetics*. 2019; 36: 371-81. doi:10.1007/s10815-018-1385-0.
10. Sarrate Z., Vidal F., Blanco J. Role of sperm fluorescent in situ hybridization studies in infertile patients: indications, study approach, and clinical relevance. *Fertil Steril.* 2010; 93(6):1892-1902. doi:10.1016/j.fertnstert.2008.12.139.
11. Balasar Ö., Acar H. Investigation of the interchromosomal effects in male carriers with structural chromosomal abnormalities using FISH. *Turk J. Urol.* 2020; 46(3): 178-85. doi:10.5152/tud.2020.19255.
12. Anton E., Vidal F., Blanco J. Reciprocal translocations: tracing their meiotic behavior. *Genet Med.* 2008; 10: 730-8. doi:10.1097/GIM.0b013e318187760f.
13. Shi Q., Martin R.H. Aneuploidy in human spermatozoa: FISH analysis in men with constitutional chromosomal abnormalities, and in infertile men. *Reproduction*. 2001; 121(5): 655-66. doi:10.1530/rep.0.1210655.
14. Tarylcheva A.A., Markova Zh.G., Sorokina T.M., Chernyh V.B., Shilova N.V. The frequency of aneuploidy in sperm in men with impaired fertility. *Meditsinskaya genetika*. 2020; 19(3): 89-90. doi:10.25557/2073-7998.2020.03.89-90. (in Russian)
15. Calogero A.E., Burrello N., A De Palma, Barone N, D'Agata R., Vicari E. et al. Sperm aneuploidy in infertile men. *Reproductive BioMedicine Online*. 2003; 6(3): 310-7. doi:10.1016/S1472-6483(10)61850-0.
16. Webster A., Schuh M. Mechanisms of Aneuploidy in Human Eggs. *Trends in Cell Biology*. 2017; 27(1):55-68. doi:10.1016/j.tcb.2016.09.002.
17. Fakhraabadi M.P., Kalantar S.M., Montazeri F., Ashkezari M.D., Fakhraabadi M.P., Nejad Yazd S.S. FISH-based sperm aneuploidy screening in male partner of women with a history of recurrent pregnancy loss. *Middle East Fertil Soc J.* 2020; 25:23. doi:10.1186/s43043-020-00031-6.
18. Calogero A.E., De Palma A., Grazioso C., Barone N., Romeo R., Rappazzo G., Rosario D'Agata R. Aneuploidy rate in spermatozoa of selected men with abnormal semen parameters. *Human Reproduction*. 2001; 16(6): 1172-9.
19. Chatziparasidou A., Christoforidis N., Samolada G., Nijs M. Sperm aneuploidy in infertile male patients: a systematic review of the literature. *Andrologia*. 2015; 47(8): 847-60. doi:10.1111/and.12362.
20. Racovita S., Mosin V., Capcelea S., Misina A., Sprincean M. Chromosomal abnormalities in men with azoospermia. *The Moldovan Medical Journal*. 2021; 64(1): 50-5. doi:10.5281/zenodo.4527139.
21. Agarwal A., Said T. Role of sperm chromatin abnormalities and DNA damage in male infertility. *Hum. Reprod. Update*. 2003; 9: 331-45. doi:10.1093/humupd/dmg027.
22. Braun R.E. Packaging paternal chromosomes with protamine. *Nature Genetics*. 2001; 28:10-2. doi:10.1038/ng0501-10.
23. Bragina E.E., Arifulin E.A., Lazareva E.M., Lelekova M.A., Kolomiec O.L., Chogovadze A.G. et al. Abnormal chromatin condensation in spermatozoa and DNA fragmentation in spermatozoa: Is there a correlation? *Andrologiya i genital'naya khirurgiya*. 2017; 18(1): 48-61. doi:10.17650/2070-9781-2017-18-1-48-61. (in Russian)
24. Arifulin E.A., Bragina E.E., Zamjatnina V.A., Volkova E.G., Sheval' E.V., Golyshev S.A. et al. Chromatin Folding in Human Spermatozoa. I. Dynamics of Chromatin. Remodelling in Differentiating Human Spermatids *Ontogenez*. 2012; 43(2): 143-53. (in Russian)
25. Bragina E.E., Zamyatnina V.A., Bocharova E.N., Shileyko L.V., Kurilo L.F., Gusak Yu.K. Quantitative electron microscopic examination of sperm for male infertility diagnosis. *Andrologiya i*

- genital'naya khirurgiya*. 2009; 1: 44–9. doi: 10.17650/2070-9781-2014-1-41-50 (in Russian)
26. Zirkin B.R., Perreault S.D., Naish S.J. Formation and function of the male pronucleus during mammalian fertilization. *The Molecular Biology of Fertilization*. 1989; 91–114.
 27. Yanagimachi R. Mammalian fertilization. *The Physiology of Reproduction*. 2nd ed. 1994; 189–317.
 28. Seligman J., Kosower N.S., Weissenberg R., Shalgi R. Thioldisulfide status of human sperm proteins. *Journal of Reproduction and Fertility*. 1994; 101: 435–43.
 29. Motoishi M., Goto K., Tomita K., Ookutsu S., Nakanishi Y. Decondensation of bull and human sperm nuclei by dithiothreitol and/or heparin. *Journal of Reproduction and Development*. 1996; 42: 7–13.
 30. Galli C., Vassilive I., Lagutina I., Galli A., Lazzari G. Bovine embryo development following ICSI: effect of activation, sperm capacitation and pre-treatment with dithiothreitol. *Theriogenology*. 2003; 60: 1467–80.
 31. Santos T.A., Dias C., Brito R., Santos A.A. Analysis of Human Spermatozoa by Fluorescence In Situ Hybridization with Preservation of the Head Morphology Is Possible by Avoiding a Decondensation Treatment. *J. Assist. Reprod. Genet.* 2002; 19: 291–4. doi:10.1023/A:1015781330919.
 32. Arumugam M., Shetty D.P., Kadandale J.S., Nmilu S.K. Association of Sperm Aneuploidy Frequency and DNA Fragmentation Index in Infertile Men. *J. Reprod. In-fertil.* 2019; 20(3): 121-6.
 33. Han J.C., Han G.Y. A procedure for quantitative determination of Tris(2-Carboxyethyl)phosphine, an odorless reducing agent more stable and effective than dithiothreitol. *Anal. Biochem.* 1994; 220(1): 5-10. doi:10.1006/abio.1994.1290.
 34. Roszkowski M., Mansuy I.M. High Efficiency RNA Extraction From Sperm Cells Using Guanidinium Thiocyanate Supplemented With Tris(2-Carboxyethyl)Phosphine. *Front. Cell Dev. Biol.* 2021; 9: 648274. doi:10.3389/fcell.2021.648274.
 35. Santarino I., Oliveira S.C.B., Oliveira-Brett A. Protein reducing agents dithiothreitol and tris(2-carboxyethyl)phosphine anodic oxidation. *Electrochemistry Communications*. 2012; 23: 114-7. doi:10.1016/j.elecom.2012.06.027.