

ДІЯ ФІЗИЧНИХ ФАКТОРІВ НА БІОЛОГІЧНІ ОБ'ЄКТИ

УДК 517.113:616.69-008.6:615.014.41

СТАН ДЕКОНДЕНСАЦІЇ ХРОМАТИНУ В СПЕРМІЯХ ЛЮДИНИ ПІСЛЯ КРІОКОНСЕРВУВАННЯ ТА ВПЛИВУ ЕЛЕКТРОМАГНІТНОГО ВИПРОМІНЮВАННЯ МІЛІМЕТРОВОГО ДІАПАЗОНУ**Н.О. Волкова, О.В. Павлович, Г.О. Гапон, О.Т. Ніколов****Інститут проблем кріобіології і кріомедицини НАН України, Харків, вул. Переяслівська 23, 61015***Харківський національний університет ім. В.Н. Каразіна, Харків, пл. Свободи 4, 61077*

Надійшла до редакції 11 листопада 2013 року

Прийнята до друку 29 листопада 2013 року

В роботі проведено дослідження впливу електромагнітного випромінювання міліметрового діапазону щільністю $0,03 \text{ мВт/см}^2$ на кріоконсервовані спермії людини в нормі та при патології. Оцінку морфо-функціонального стану сперміїв до та після опромінення оцінювали за допомогою світлової, люмінесцентної мікроскопії та методу ФАКС-аналіза. Застосування опромінювання зразків на протязі 15 хвилин при нормозооспермії та 5 хвилин при астенозооспермії призводило до вірогідного збільшення 7AAD^+ сперміїв стосовно відповідного показника в групі контролю. Встановлено, що вплив електромагнітного випромінювання міліметрового діапазону щільністю $0,03 \text{ мВт/см}^2$ на кріоконсервовані спермії людини на протязі 5 хвилин при нормозооспермії та 15 хвилин при астенозооспермії призводить до збільшення фракцій сперміїв з прямолінійним рухом без змін цілісності мембрани, стану деконденсації хроматину та генерації процесів апоптозу.

КЛЮЧОВІ СЛОВА: спермії людини, кріоконсервування, електромагнітне випромінювання, рухливість, деконденсація, хроматин, апоптоз.

СОСТОЯНИЕ ДЕКОНДЕНСАЦИИ ХРОМАТИНА В СПЕРМИЯХ ЧЕЛОВЕКА ПОСЛЕ КРИОКОНСЕРВИРОВАНИЯ И ЭЛЕКТРОМАГНИТНОГО ОБЛУЧЕНИЯ МИЛЛИМЕТРОВОГО ДИАПАЗОНА**Н.А. Волкова, Е.В. Павлович, А.А. Гапон, О.Т. Ніколов****Інститут проблем кріобіології і кріомедицини НАН України, г. Харків, ул. Переяславская 23, 61015***Харківський національний університет ім. В.Н. Каразіна, г. Харків, пл. Свободи 4, 61077*

В работе проведено исследование влияние электромагнитного излучения миллиметрового диапазона плотностью $0,03 \text{ мВт/см}^2$ на кріоконсервированные спермии человека в норме и при патологии. Оценку морфо-функціонального состояния спермиев до и после облучения оценивали при помощи световой, люмінесцентной мікроскопії и метода ФАКС-аналіза. Применение облучения образцов в течении 15 минут при нормозооспермии и 5 минут при астенозооспермии приводило к достоверному увеличению 7AAD^+ спермиев относительно соответствующего показателя в группе контроля. Установлено, что воздействие электромагнитного излучения миллиметрового диапазона плотностью $0,03 \text{ мВт/см}^2$ на кріоконсервированные спермии человека в течение 5 минут при нормозооспермии и 15 минут при астенозооспермии приводит к увеличению фракции спермиев с прямолинейным движением без изменения целостности мембраны, состояния ядерного хроматина и генерации процессов апоптоза.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: кріоконсервированные спермии человека, електромагнітне облучение, подвижность, хроматин, апоптоз.

DECONDENSATION OF CHROMATIN STATE IN HUMAN SPERM CELLS AFTER CRYOPRESERVATION AND ELECTROMAGNETIC IRRADIATION OF MILLIMETER RANGE**N.O. Volkova, O.V. Pavlovich, G.O. Gapon, O.T. Nikolov****Institute for Problems Cryobiology and Cryomedicine NAS Ukraine, Kharkov, st. Pereyaslavskaya 23, 61015***V.N. Karazin National University, Kharkov, sq. Svobody 4, 61077*

In the work investigated the effects of electromagnetic irradiation of millimeter range of 0.03 mW/cm^2 density on cryopreserved human sperm in normal and pathological state. Morpho-functional state of sperm before and after irradiation was assessed using light, fluorescence microscopy and FACS analysis. Application of irradiation of the samples for 15 minutes at normospermia and 5 minutes at asthenozoospermia resulted in a significant increase in 7AAD^+ sperm about the appropriate value in the control group. It has been found that electromagnetic irradiation of millimeter range of 0.03 mW/cm^2 density on cryopreserved human sperm for 5 minutes at normospermia and 15 minutes at asthenozoospermia increases the fraction of rectilinearly moving sperm without changing the integrity of membrane, nuclear chromatin state and generation of apoptosis.

KEY WORDS: cryopreserved human sperm, electromagnetic irradiation, motility, chromatin, apoptosis.

Перспективним напрямком у розробці методів підвищення якості спермій після кріоконсервування є використання фізичних чинників, з метою збільшення відсотку рухливості і запліднюючої здатності чоловічих гамет [1-3]. Безпосередньо проблема морфо-функціонального стану спермій після кріоконсервування стосується еякулятів при патоспермії, оскільки в даному випадку має місце низьке відновлення клітин після відігріву і, як слідство, їх низька запліднююча здатність. Примусове підвищення функціонального стану клітин може призводити до порушення їх генетичного апарату, що може бути викликано процесом кріоконсервування, маніпуляціями, які проведені на етапах підготовки до та після заморожування.

Низькоінтенсивне електромагнітне випромінювання міліметрового діапазону широко використовується в різних областях практичної медицини (для поліпшення стану реології крові, стимуляції репаративних процесів, в комплексній протизапальній терапії та інше) [3]. При дії на біологічний об'єкт електромагнітного випромінювання високої потужності або значної тривалості на перший план виходить неспецифічна теплова дія, але значно більший інтерес викликає низькоінтенсивне електромагнітне випромінювання, здатне викликати цілий ряд специфічних біологічних феноменів. Зовнішнє електромагнітне випромінювання міліметрового діапазону імітує власне випромінювання організму і в процесі терапії виконує дію «синхронізуючого пристрою», який відновлює втрачену організмом функцію в процесі захворювання. Регуляторами фізичних і хімічних процесів, які залучені в загальну схему метаболізму клітини є білкові молекули, які перебувають на поверхні клітин у функціонально активному стані та приймають безпосередню участь у реалізації дії зовнішніх факторів. Однак основними об'єктами, які призводять до відновлення функції в мембранах клітин (акустоелектричні хвилі або коливання Фреліха) є молекули води, а головними елементами, з якими пов'язано збудження в мембранах акустико-електричних хвиль, мембранні рецептори, які і реагують на зовнішнє стимулювання [1-3].

Проте даних про вплив низькоінтенсивного електромагнітного випромінювання міліметрового діапазону на спермії людини, а зокрема на стан ядерного хроматину, досить мало. Наявні дані носять суперечливий характер і у ряді випадків викликають сумніви через відсутність адекватних контрольних серій в проведенні експериментальних досліджень.

Таким чином, дослідження впливу електромагнітного випромінювання міліметрового діапазону для поліпшення якості сперми пацієнтів з астенозооспермією після кріоконсервування є перспективним напрямком у кріобіологічних дослідженнях.

Мета роботи – дослідження впливу електромагнітного випромінювання міліметрового діапазону на стан деконденсації хроматину в сперміях людини після кріоконсервації.

МАТЕРІАЛИ І МЕТОДИ

В роботі були досліджені кріоконсервовані зразки еякулятів чоловіків-донорів у віці від 30 до 40 років при нормо- і астенозооспермії (n=30). Оцінку еякуляту проводили відповідно до рекомендацій ВООЗ [4]. Кріоконсервування проводили використовуючи в якості кріозахисного середовища 4% гліцерин і 20% БСА на розчині Хенкса. Після 10-15-хвилинної еквілібрації з кріозахисного середовищем суспензію розфасовували по 0,5-0,7 мл в полімерні трубочки довжиною 70-80 мм, зовнішнім діаметром 3,8 мм і товщиною стінок 120 мкм, герметизували і маркували. Кріоконсервування проводили в умовах кріосховища. На першому етапі охолодження зразків проводилося від 25 до 4 °С з наступним охолодженням до -70 °С у парах рідкого азоту протягом 30 хвилин. По досягненні вказаного часу проводили занурювання у

рідкий азот -196°C . Зразки зберігали на протязі 2-х місяців в умовах низькотемпературного банку. Відігрівання здійснювали на водяній бані при 37°C .

Вивчення дії електромагнітного випромінювання міліметрового діапазону на спермії людини після кріоконсервування-відігріву проводили із застосуванням генератора Г4-141 з довжиною хвилі $\lambda=7,1$ мм, з частотою 42,25 ГГц при потужності $P=0,3$ мВт з щільністю випромінювання $0,03$ мВт/см² протягом 5, 10 і 15 хвилин. Зразки в об'ємі 0,3 мл, вміщували до лунок пластикових планшетів з $d=1$ см². Товщина шару зразків еякуляту складала 1,5-2 мм. Контролем були не опромінені зразки.

Відразу після кріоконсервування-відігріву проводили опромінення зразків електромагнітним полем. В експериментальних та контрольних зразках візуально оцінювали відсоток активно-рухливих спермій, цілісність мембрани, стан хроматину. У досліджених зразках сперми візуально оцінювали показник рухливості - кількість спермій з швидким та повільним прямолінійним рухом (фракція а + в) з використанням світлового мікроскопу МБИ 15-У. Життєздатність спермій оцінювали в мазках, пофарбованих еозин-нігрозином. Визначали процентне співвідношення живих і мертвих спермій, використовуючи той факт, що в препараті головки живих спермій безбарвні, а головки мертвих - забарвлюються еозином в рожевий колір.

Оцінку стану хроматину спермій проводили, використовуючи метакроматичну властивість акридину оранжевого (АО), який флуоресцює зеленим, коли зв'язується з подвійним ланцюгом ДНК, і червоним, коли він зв'язується з одиночним ланцюгом (деконденсованою) ДНК. Відсоток спермій з конденсованим і деконденсованим хроматином в мазках визначали на флуоресцентному мікроскопі Ломо Мікмед (Росія).

Методом ФАКС-аналізу на проточному цитофлюориметрі FACS Calibur фірми Becton-Dickinson (США) досліджували процеси деконденсації хроматину в сперміях з використанням реагентів Becton-Dickinson. Проникаючий барвник 7-аміноактіноміцин D (7-AAD) зв'язується з нуклеїновими кислотами. 7-AAD притамана флуоресценція в червоному діапазоні спектра [5]. Наявність/відсутність апоптозу встановлювали за допомогою Annexin-V (Becton-Dickinson). Забарвлення здійснювали за стандартною методикою фірми виробника. Результати аналізували за допомогою програми Win MDI v.2.8.

При статистичній обробці результатів використовували однофакторний дисперсійний аналіз і t-критерій Стьюдента за допомогою програми Microsoft Office Excel 2007.

РЕЗУЛЬТАТИ Й ОБГОВОРЕННЯ

Першим етапом роботи було дослідження впливу крайне високих частот (КВЧ) на рухливість спермій після кріоконсервування. Відомо, що кількість спермій зі швидким прямолінійним рухом є найбільш вагомим критерієм, який визначає успішність допоміжних репродуктивних технологій (ДРТ). Отримані результати наведені на рис.1.

Опромінювання на протязі 5 хвилин кріоконсервованих зразків спермій при нормозооспермії призводило до підвищення рухливості фракції «а+в» на $14\pm 2\%$ ($p<0,05$) та складало $58\pm 2\%$. Однак збільшення часу опромінювання призводило до поступового зниження фракції активно рухомих спермій в розглянутому випадку до ісходного показника після 10 хвилин опромінювання. Інша картина спостерігалася при дії КВЧ на кріоконсервовані зразки спермій при астенозооспермії, а саме підвищення кількості спермій зі швидким та повільним прямолінійним рухом при збільшенні часу опромінювання. Вірогідне збільшення відсотку фракції «а+в» при астенозооспермії визначалося при 15 хвил опромінювання, а саме підвищення на $12\pm 3\%$ ($p<0,05$) та складало $32\pm 2\%$.

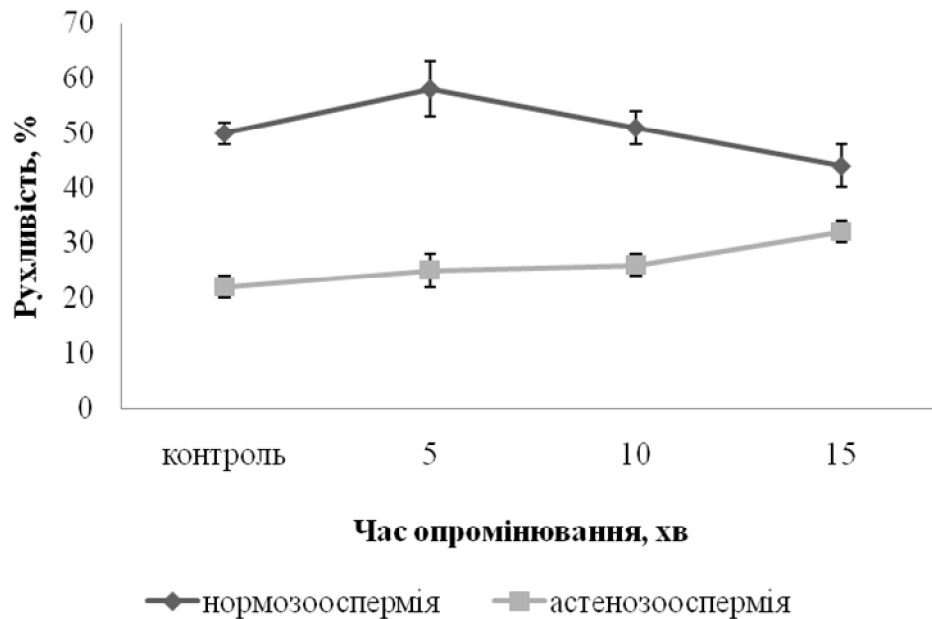


Рис.1 Рухливість спермій людини після кріоконсервування-відігріву та наступного опроміювання КВЧ.

Наступним етапом роботи було дослідження впливу КВЧ випромінювання на життєздатність спермій після кріоконсервування-відігріву. Забарвлення еозином відображає цілісність мембрани головки спермій, оскільки при її порушенні барвник проникає саме в цю область. Отримані дані по визначенню відсотка спермій з неушкодженою мембраною (життєздатність) після кріоконсервування-відігріву та опроміювання КВЧ наведені на рис.2.

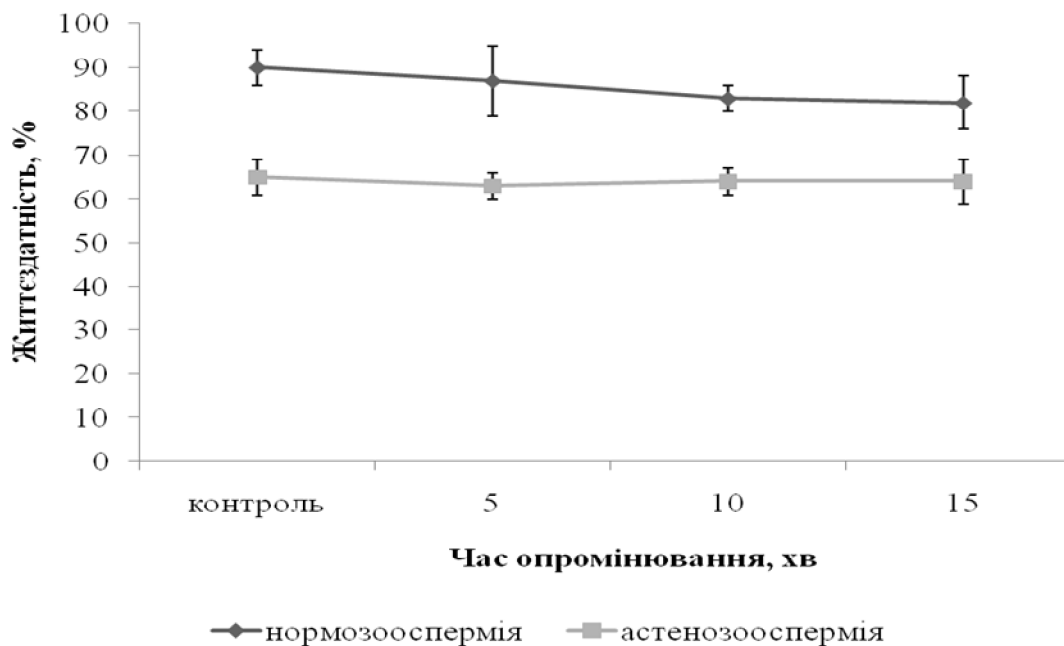


Рис.2 Відсоток спермій людини після кріоконсервування та наступного опроміювання КВЧ з неушкодженою мембраною.

Життєздатність спермійів при нормозооспермії після кріоконсервування-відігріву становила $87,2 \pm 2,3\%$, при астенозооспермії – $65,4 \pm 4,2\%$. Застосування КВЧ випромінювання на протязі 5, 10, 15 хвилин не призводило до вірогідних змін в кількості спермійів з ушкодженою мембраною в досліджених зразках при астенозооспермії. В зразках з нормозооспермією спостерігалось збільшення кількості спермійів з профарбованими мембранами $8,6 \pm 1,2\%$ при опромінюванні 15 хвилин. Отримані дані свідчать, що КВЧ випромінювання в дослідженій потужності призводить до підвищення кількості активно-рухомих спермійів та не призводить до змін в цілісності мембрани головки спермійів після кріоконсервування-відігріву у випадку астенозооспермії.

Результати по рухливості та життєздатності спермійів свідчать про відсутність ушкоджуючої дії КВЧ опромінювання, однак показники рухомості, цілісності мембрани та стану хроматину не завжди корелюють. Наступним етапом було проведення дослідження впливу КВЧ випромінювання на стан конденсації хроматину спермійів після кріоконсервування – відігріву. Була проведена серія досліджень по з'ясуванню наявності некротичних та апоптотичних процесів у кріоконсервованих сперміях в нормі та при патології за умов дії КВЧ випромінювання. Для визначення наявності некрозу в сперміях ми застосували люмінесцентний барвник акридин оранжевий та 7AAD, для апоптотичних процесів - Annexin V. При забарвленні АО колір головки спермія визначається тіолдисульфідним станом ДНК та асоційованими протамінами у ядрі. Флуорохром АО включається у подвійний ланцюг ДНК як мономер, в одинарну нить - як агрегат. Мономерний зв'язок акридина оранжевого з нативною ДНК флуоресцує зеленим кольором, у той час як агрегований АО флуоресцує червоним кольором [6]. Аномально висока кількість голівок спермійів з денатурованим хроматином (червоне світіння) в еякуляті корелює зі зниженням фертильності сперми. Відповідно, високий процент спермійів з конденсованим хроматином (зелене світіння) є індикатором високої фертильності гамет. Дані по забарвленню АО кріоконсервованих зразків спермійів після опромінювання представлені на рис.3.

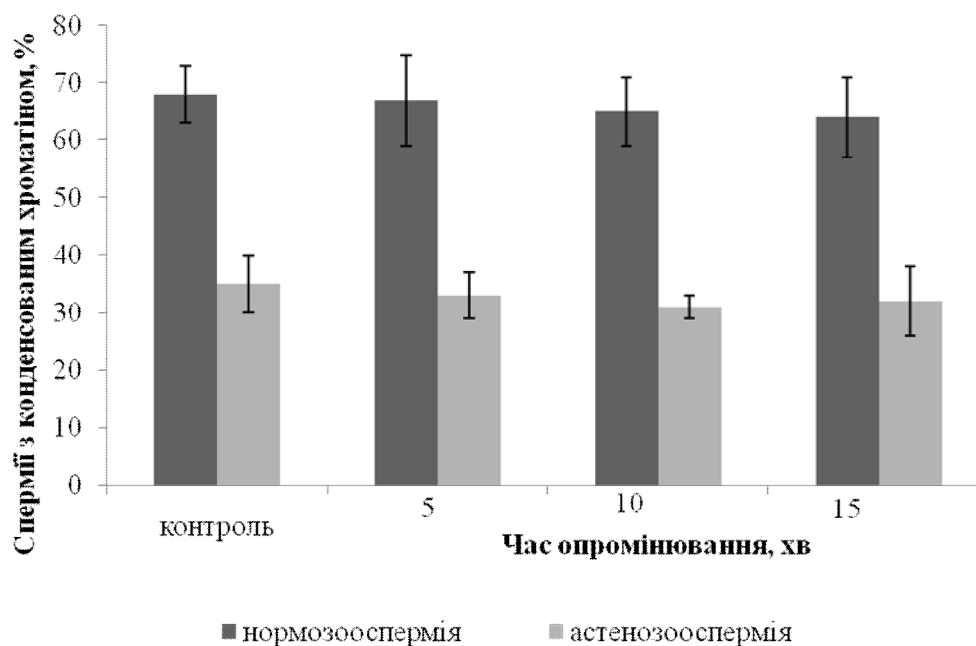


Рис.3 Стан нуклеарного хроматина (фарбування АО) спермійів людини після кріоконсервування та наступного опромінювання КВЧ.

Після кріоконсервування в зразках з нормо- та астенозооспермією кількість спермій з конденсованим хроматином (зелене світіння) складало $68 \pm 5\%$ і $35 \pm 3\%$ відповідно. Використання КВЧ випромінювання на протязі 5, 10 та 15 хвилин не призводило до вірогідних змін дослідженого показника у кріоконсервованих зразках спермій при нормо- та астенозооспермії відносно відповідного контролю.

Залучення для аналізу проточної цитофлюориметрії дає безсумнівні переваги у порівнянні з використанням мікроскопії, оскільки дає можливість з високою точністю оцінити за деякими параметрами велику кількість клітин, що призводить до високої статистичної вірогідності результатів. Далі були проведені дослідження впливу КВЧ випромінювання на стан нуклеарного хроматину спермій після кріоконсервування-відігріву за допомогою проточної цитофлюориметрії з використанням зондів 7AAD [5]. та Annexin V [7]. Отримані результати по наявності відсотку 7AAD⁺ та Annexin V⁺ при нормозооспермії наведені в табл 1.

Таблиця 1.

Вплив КВЧ випромінювання на відсоток некротичних та апоптотичних спермій після кріоконсервування при нормозооспермії, % (n=10, M±m)

Зразок	AnnexinV ⁻ /7AAD ⁻ , %	AnnexinV ⁻ /7AAD ⁺ , %	Annexin V ⁺ /7AAD ⁻ , %
Контроль	97,38±0,15	2,15±0,07	0,47±0,03
Опромінювання 5 хв	97,34±0,28	2,21±0,05	0,45±0,06
Опромінювання 10 хв	97,36±0,17	2,18±0,09	0,46±0,08
Опромінювання 15 хв	96,21±0,29	3,30±0,03*	0,49±0,05

Примітка: *- вірогідно відносно до контрольних значень, p<0,05.

Кількість життєздатних спермій (AnnexinV⁻/7AAD⁻) при нормозооспермії після кріоконсервування-відігріву складало $97,38 \pm 0,15\%$. Цей показник залишався у межах контрольних значень на протязі всього досліду з використанням опромінювання. Слід зазначити, що КВЧ опромінювання на протязі 5, 10 та 15 хвилин не призводило до вірогідної зміни відсотку AnnexinV⁺ спермій. Однак, при застосуванні опромінювання на протязі 15 хвилин спостерігалось вірогідне збільшення 7AAD⁺ спермій стосовно відповідного показника в групі контролю.

Отримані результати по наявності відсотку 7AAD⁺ та Annexin V⁺ при астенозооспермії наведені в табл. 2. Кількість AnnexinV⁻/7AAD⁻ спермій при астенозооспермії після кріоконсервування-відігріву складала $94,18 \pm 0,24\%$. Вірогідних змін у відсотку Annexin V⁺ спермій після кріоконсервування-відігріву та застосування КВЧ випромінювання на протязі 5, 10 та 15 хвилин не спостерігалось. В досліджених зразках після 5 хвилин опромінювання спостерігалось вірогідне збільшення 7AAD⁺ спермій відносно відповідного показника в групі контролю.

Таблиця 2.

Вплив КВЧ випромінювання на відсоток некротичних та апоптотичних спермій після кріоконсервування при астенозооспермії, % (n=10, M±m)

Зразок	AnnexinV ⁻ /7AAD ⁻ , %	AnnexinV ⁻ /7AAD ⁺ , %	Annexin V ⁺ /7AAD ⁻ , %
Контроль	94,18±0,24	5,25±0,05	0,57±0,07
Опромінювання 5 хв	93,02±0,21	6,39±0,04*	0,59±0,05
Опромінювання 10 хв	94,04±0,15	5,39±0,05	0,57±0,03
Опромінювання 15 хв	94,15±0,04	5,27±0,13	0,58±0,02

Примітка: *- вірогідно стосовно контрольних значень p<0,05.

Проведені дослідження по визначенню нуклеарного стану можуть бути використані як якісний показник запліднюючої здатності кріоконсервованих чоловічих гамет [5, 7]. Отримані результати свідчать про те, що застосування КВЧ випромінювання не призводить до активізації апоптотичних процесів (Annexin V⁺ спермії) після кріоконсервування-відігріву за умов нормо- та астенозооспермії. На наш погляд, отримані результати пов'язані із унікальною організацією цитоплазми і ядра зрілих сперматозоїдів, завдяки чому стає малоімовірним, що запрограмована загибель може ініціюватися в зрілих чоловічих гаметах [8-10]. Фрагментована ДНК сперміїв, скоріш за все, є результатом незавершеного процесу апоптозу на ранніх етапах диференціювання. Доля сперміїв з ознаками апоптозу складає у донорів сперми 0,1%, при варікоцелі, наявності інфекції і глобулоспермії — до 10%, у пацієнтів з безпліддям — 25% [11-12].

Збільшення відсотку 7AAD⁺ сперміїв спостерігалось за умов нормоспермії при 15 хвилинах опромінювання та при 5 хвилини при астенозооспермії. Слід зазначити, що наведених змін в стані хроматина сперміїв в нормі та при патоспермії не було отримано при використанні тесту на забарвлення акридиновим оранжевим, що можливо пов'язано, по-перше з низьким відсотком порушень у компактизації хроматина, та по-друге, з похибкою самого метода люмінесцентної мікроскопії.

Аналіз отриманих результатів дає можливість встановити, що застосування КВЧ випромінювання за умов $\lambda=7,1$ мм, з частотою 42,25 ГГц та потужністю P=0,3 мВт з щільністю випромінювання 0,03 мВт/см² призводить до збільшення фракції активнорухомих сперміїв при нормоспермії за умов опромінювання 5 хвил, а при астенозооспермії - за умов 15 хвил (рис.1) без змін у стані мембрани (рис.2) і ядерного хроматину (табл. 1,2). Отриманий в роботі стимулюючий ефект електромагнітного випромінювання міліметрового діапазону ймовірно пов'язаний з універсальним механізмом передачі інформації як між живими об'єктами, так і між клітинами в межах біологічного об'єкту. Цей механізм заснован на двох фундаментальних положеннях: здатності живих об'єктів генерувати власне і реагувати на зовнішнє випромінювання [1-3]. Проведення детальних усебічних досліджень перед застосуванням кріоконсервованих зразків сперміїв з врахуванням показника рухливості, порушень цілісності мембрани та організації хроматина як факторів, що впливають на процеси ембріогенезу є необхідним етапом у ДРТ [12-17].

ВИСНОВКИ

1. Застосування електромагнітного опромінювання міліметрового діапазону на протязі 5 хвилин при нормозооспермії та 15 хвилин при астенозооспермії призводить до збільшення фракцій сперміїв з прямолінійним рухом без змін цілісності мембрани та стану деконденсації хроматину.
2. Опромінення зразків після кріоконсервування-відігріву на протязі 15 хвилин при нормозооспермії та 5 хвилин при астенозооспермії призводило до вірогідного збільшення 7AAD⁺ сперміїв.
3. КВЧ опромінення на протязі 5, 10 та 15 хвилин не призводило до появи Annexin V⁺ сперміїв при нормо- та астенозооспермії.

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Взаимодействие физических и биологических объектов с электромагнитным излучением КВЧ-диапазона / В. И. Петросян, Ю. В. Гуляев, Э. А. Житенева [и др] // Радиотехника и электроника. – 1995. – Т. 40., Вып. 1. – С. 127–134. /Vzaimodeystvie fizicheskikh i biologicheskikh ob'ektov s elektromagnitnym izlucheniem KVCh-diapazona / V. I. Petrosyan, Yu. V. Gulyaev, E.A. Zhiteneva [i dr] // Radiotekhnika i elektronika. – 1995. – Т.40, №1. – S. 127–134./

2. Метод оценки электромагнитного отклика биологической системы при воздействии лазерного излучения / В. Г. Колесников, Н. В. Древаль, Ю. Е. Каменев [и др] // Физика живого. – 2008. – Т. 16., № 2. – С. 70–77. /Metod ocenki elektromagnitnogo otklika biologicheskoy sistemy pri vozdeystvii lazernogo izlucheniya / V. G. Kolesnikov, N. V. Dreval, Yu. E. Kamenev [i dr] // Fizika zhivogo. – 2008. – Т. 16., №2. – С. 70–77./
3. Бецкий О. В. Современные представления о механизмах воздействия низкоинтенсивных миллиметровых волн на биологические объекты / О. В. Бецкий, Н. Н. Лебедева // Мат. междунар. симп. «Миллиметровые волны в медицине и биологии» Москва, 1999. – С.130–133. /Betskiy O. V. Sovremennyye predstavleniya o mehanizmah vozdeystviya nizkointensivnykh millimetrovyykh voln na biologicheskie ob'ekty / O. V. Betskiy, N. N. Lebedeva // Mat. mezhdunar. simp. «Millimetrovyye volny v meditsine i biologii» Moskva. – 1999. – С. 130–133./
4. WHO laboratory manual for the Examination and processing of human semen FIFTH EDITION / World Health Organization, Department of Reproductive Health and Research. – 2010. – P.287.
5. Strategies for phenotyping apoptotic peripheral human lymphocytes comparing ISNT, annexin-V and 7-AAD cytofluorometric staining methods / H. Lecoeur, E. Ledru, M. C. Prévost, M. L. Gougeon // J Immunol Methods. – 1997. –V. 209, №2. – P.111–123.
6. Семенова Е. В. Критерий оценки состояния хроматина ядер сперматозоидов человека с помощью техники проточной цитометрии — тест на фертильность / Е. В.Семенова, Е. А. Дробченко, М. В. Филатов // Цитология. – 2002. – Т. 44, № 5. – С. 470–476. /Semenova E. V. Kriteriy ocenki sostoyaniya hromatina yader spermatozoidov cheloveka s pomoshchyu tehniky protochnoy citometrii — test na fertilnost / E. V.Semenova, E. A. Drobchenko, M. V. Filatov // Citologiya. – 2002. – Т.44, №5. – С. 470–476.
7. Мужское бесплодие и нарушение структурной организации хроматина сперматозоидов. Существует ли связь? / О. А. Воробьева, А. В. Воскресенская, А. А. Одинцов [и др] // Проблемы репродуктологии. – 2005. – №6. – С.56–62. /Muzhskoe besplodie i narushenie strukturnoy organizatsii hromatina spermatozoidov. Sushchestvuet li svyaz? / O.A.Vorobieva, A.V. Voskresenskaya, Odincov A.A. [i dr] // Problemy reproduktologii. – 2005. – №6. – С. 56–62./
8. Study of two markers of apoptosis and meiotic segregation in ejaculated sperm of chromosomal translocation carrier patients / F. Brugnon, E. Van Assche, G. Verheyen [et al.] // Human Reproduction. – 2006. – №21. – P.683-685.
9. Barroso G. Analysis of DNA fragmentation, plasma membrane translocation of phosphatidylserine and oxidative stress in human spermatozoa / G. Barroso, M. Morshedi, S. Oehninger // Hum. Reprod. – 2000. – №15. – P.1338 – 1344.
10. DNA integrity in human spermatozoa relationships with semen quality / D. S. Irvine, J. P. Twigg, E. L. Gordon [et al] // Journal of Andrology. – 2000. – №21. – P.33–44.
11. Sun J. G. Detection of deoxyribonucleic acid fragmentation in human sperm: correlation with fertilization in vitro / J. G. Sun, R. F. Jurisicova, A. Casper // Biology of Reproduction. – 1997. – №56. – P.602–607.
12. Integrating new tests of sperm genetic integrity into semen analysis: breakout group discussion / S. D. Perreault, R. J. Aitken [et al.] // Adv. Exp. Med. Boil. – 2003. – V.518. – P. 253—268.
13. Blanc-Layrac G. Morphological and biochemical analysis of cell death inhuman ejaculated spermatozoa / G. Blanc-Layrac, A. F. Bringuier, R Guillot // Cell Mol Biol. – 2000; 46: 1: 187–197.
14. Apoptosis and necrosis in human ejaculated spermatozoa / N. Lachaud, J.Tesarik, M.L. Canadas [et al.] // Hum Reprod.-2004. – V.19. – P. 607-610.
15. Schlegel P.N. Yet another test of sperm chromatin structure / P.N.Schlegel, D.A. Paduch // Fertil Steril. – 2005. – V.84. – P.854-859.
16. Seli E. Spermatozoal nuclear determinants of reproductive outcome: implications for ART / E. Seli, D. Sakkas // Human Reproduction. – 2005. – №11. – P.337-349.
17. 7-Aminoactinomycin D for apoptosis staining in flow cytometry / N. Zembruski, V. Stache, W. Haefeli, J. Weiss // Analytical Biochemistry. – 2012. –V. 429. – P.79–81.