

Фрагментация ДНК в сперматозоидах у мужчин, вакцинированных препаратом Гам-КОВИД-Вак (Спутник V)

Т.М. Сорокина¹, Е.Е. Брагина^{1,2}, Е.А. Сорокина^{3,4}, А.О. Седова¹, М.И. Штаут¹, Л.Ф. Курило¹, В.Б. Черных^{1,5}

¹ФГБНУ «Медико-генетический научный центр им. акад. Н.П. Бочкова»; Россия, 115522 Москва, ул. Москворечье, 1;

²Научно-исследовательский институт физико-химической биологии им. А.Н. Белозерского ФГБОУ ВПО «Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова»; Россия, 119992 Москва, Ленинские горы, 1, стр. 40;

³ФГБУ «Национальный исследовательский центр «Курчатовский институт»; Россия, 123182 Москва, пл. Академика Курчатова, 1;

⁴Российский университет дружбы народов (РУДН); Россия, 117198 Москва, ул. Миклухо-Маклая, 6;

⁵ФГАОУ ВО «Российский национальный исследовательский медицинский университет им. Н.И. Пирогова»; Россия, 117997 Москва, ул. Островитянова, 1

Контакты: Сорокина Татьяна Михайловна reprolab@med-gen.ru

Цель исследования – сравнительный анализ спермиологических показателей и фрагментации ДНК в сперматозоидах (ФДС) у мужчин, вакцинированных препаратом Гам-КОВИД-Вак (Спутник V), и у невакцинированных мужчин.

Материалы и методы. Проанализированы показатели спермограмм и индекс ФДС в образцах эякулята у 122 мужчин, среди которых 28 мужчин прошли вакцинацию препаратом Гам-КОВИД-Вак (Спутник V). Участники исследования не имели в анамнезе коронавирусной инфекции COVID-19. Вакцинированные пациенты были разделены на 2 группы: 1-я группа ($n = 10$) – мужчины, срок между полной (2 курса препарата) вакцинацией которых и сдачей эякулята не превышал 75 дней, и 2-я группа ($n = 18$) – мужчины, срок между вакцинацией которых и сдачей эякулята превышал 75 дней. Невакцинированные мужчины составили группу сравнения (3-я группа, $n = 94$). Стандартное спермиологическое исследование выполнено согласно рекомендациям общепринятого лабораторного Руководства Всемирной организации здравоохранения (2010). ФДС оценивали методом флуоресцентного мечения одно- и двунитевых разрывов ДНК (TUNEL).

Результаты. Показатель общего количества сперматозоидов в 1-й группе составил – 265 ± 75 млн, во 2-й группе – 355 ± 67 млн, в 3-й группе III – 304 ± 26 млн. Количество прогрессивно подвижных (PR) сперматозоидов составило: в 1-й группе – $18,5 \pm 1,9$ %, во 2-й группе – $23,2 \pm 3,0$ %, в 3-й группе – $18,2 \pm 1,1$ %. Количество морфологически нормальных сперматозоидов: в 1-й группе – $4,0 \pm 0,5$ %, во 2-й группе – $5,8 \pm 0,9$ %, в 3-й группе – $4,1 \pm 0,3$ %. Лучшее качество эякулята выявлено у пациентов 2-й группы, однако статистически значимых различий в показателях спермограмм среди групп пациентов не получено. Количество сперматозоидов с фрагментированной ДНК (индекс ФДС) в 1-й группе варьировало от 4,6 до 31,4 %, во 2-й группе – от 0,8 до 36,5 %, в 3-й группе (сравнения) – от 1,3 до 39,8 %. Среднее количество гамет с разрывами ДНК в 1-й группе ($12,5 \pm 2,4$ %) было большим, чем во 2-й группе ($10,9 \pm 2,0$ %) и в группе сравнения ($10,5 \pm 0,7$ %), но без статистически значимого различия. Доля пациентов, у которых индекс ФДС превышал референсное значение (≤ 15 %), в 1, 2, 3-й группах составила 20, 22 и 18 % соответственно. У 3 из 6 пациентов с повышенным индексом ФДС из 1-й и 2-й групп данный показатель превышал референсные значения и до вакцинации.

Заключение. Значимого влияния вакцинации препаратом Спутник V на уровень фрагментации ДНК в сперматозоидах у мужчин не выявлено.

Ключевые слова: фрагментация ДНК, вакцинация, Спутник V, COVID-19, мужская фертильность, сперматозоиды, эякулят

Для цитирования: Сорокина Т.М., Брагина Е.Е., Сорокина Е.А. и др. Фрагментация ДНК в сперматозоидах у мужчин, вакцинированных препаратом Гам-КОВИД-Вак (Спутник V). Андрология и генитальная хирургия 2022;23(4):64–73. DOI: 10.17650/2070-9781-2022-23-4-64-73

Sperm DNA fragmentation in men vaccinated with Gam-COVID-Vac (Sputnik V)

T.M. Sorokina¹, E.E. Bragina^{1,2}, E.A. Sorokina^{3,4}, A.O. Sedova¹, M.I. Shtaut¹, L.F. Kurilo¹, V.B. Chernykh^{1,5}

¹Research Centre for Medical Genetics; 1 Moskvorech'e St., Moscow 115522, Russia;

²A.N. Belozersky Institute of Physico-Chemical Biology, Lomonosov Moscow State University; Bld. 40, 1 Leninskie Gory, Moscow 119992, Russia;

³National Research Center "Kurchatov Institute"; 1 Akademika Kurchatova Sq., 123182 Moscow, Russia;

⁴Peoples' Friendship University of Russia (RUDN University); 6 Miklukho-Maklaya St., Moscow 117198, Russia;

⁵N.I. Pirogov Russian National Research Medical University; 1 Ostrovityanova St., 117997 Moscow, Russia

Contacts: Tatyana Mikhaylovna Sorokina reprolab@med-gen.ru

Aim. To perform comparative analysis of sperm characteristics and DNA fragmentation in men vaccinated with Gam-COVID-Vac (Sputnik V) and unvaccinated men.

Materials and methods. Characteristics of semen analysis and DNA fragmentation index in ejaculate samples of 122 men, 28 of whom were vaccinated with Gam-COVID-Vac (Sputnik V), were analyzed. Study participants did not have history of coronavirus infection COVID-19. Vaccinated patients were divided into 2 groups: group 1 ($n = 10$) included patients for whom the time between full vaccination (2 doses of the vaccine) and ejaculate sampling was shorter than 75 days; and the group 2 ($n = 18$) included patients for whom the time between vaccination and ejaculate sampling was longer than 75 days. Unvaccinated men comprised the control group (group 3, $n = 94$). Standard semen analysis was performed in accordance with the accepted laboratory guidelines of the World Health Organization (2010). DNA fragmentation was evaluated using fluorescent labelling of single- and double-strand DNA breaks (TUNEL).

Results. Total sperm count in the group 1 was 265 ± 75 million, in the group 2 – 355 ± 67 million, in the group 3 – 304 ± 26 million. Progressive motile (PR) sperm in the group 1 was 18.5 ± 1.9 %, in the group 2 – 23.2 ± 3.0 %, in the group 3 – 18.2 ± 1.1 %. Normal sperm morphology in the group 1 was 4.0 ± 0.5 %, in the group 2 – 5.8 ± 0.9 %, in the group 3 – 4.1 ± 0.3 %. The best ejaculate quality was observed in patients of the group 2, however, no statistically significant differences in semen analysis characteristics between the groups were found. Percentage of sperm with fragmented DNA (DNA fragmentation index, DFI) in the group 1 varied between 4.6 and 31.4 %, in the group 2 between 0.8 and 36.5 %, in the group 3 (control) between 1.3 and 39.8 %. Mean number of germ cells with DNA breaks in the group 1 (12.5 ± 2.4 %) was higher than in the group 2 (10.9 ± 2.0 %) and control group (10.5 ± 0.7 %), but with no statistical significance. Percentage of patients with DNA fragmentation index above the reference value (≤ 15 %) in the groups 1, 2 and 3 was 20, 22 and 18 % respectively. In 3 of 6 patients with increased DFI in the groups 1 and 2, this value was above the reference level even before vaccination.

Conclusion. No significant effect of vaccination with Sputnik V on sperm DNA fragmentation level in men was observed.

Keywords: DNA fragmentation, vaccination, Sputnik V, COVID-19, male fertility, sperm, ejaculate

For citation: Sorokina T.M., Bragina E.E., Sorokina E.A. et al. Sperm DNA fragmentation in men vaccinated with Gam-COVID-Vac (Sputnik V). *Andrologiya i genital'naya khirurgiya = Andrology and Genital Surgery* 2022;23(4):64–73. (In Russ.). DOI: 10.17650/2070-9781-2022-23-4-64-73

Введение

Фрагментация ДНК в сперматозоидах (ФДС) – часто встречающееся нарушение целостности наследственного материала (хроматина) в мужских гаметах, представляющее собой одно- и двуцепочечные разрывы молекулы ДНК. Нарушение целостности ДНК, аномалии компактизации и ремоделирования хроматина и эпигенетических модификаций в созревающих мужских половых клетках снижают фертильные свойства сперматозоидов, могут негативно влиять на состояние и экспрессию отцовского генома на ранних этапах эмбрионального развития, приводя к нарушению развития эмбриона и формированию blastocysts. Поэтому повышенное количество (%) половых клеток с разрывами ДНК снижает вероятность зачатия естественным путем, а также наступления беременности в циклах экстракорпорального оплодотворения/интрацитоплазматических инъекций сперматозоидов (ЭКО/ИКСИ), повышает риск ранних репродуктивных потерь, невынашивания беременности [1, 2].

К основным механизмам, оказывающим негативное влияние на целостность ДНК сперматозоидов, относят нарушение сперматогенеза различной этиологии, дефекты созревания (ремоделирования) хроматина в мужских половых клетках, варикоцеле, активированный апоптоз, окислительный стресс и другие патогенные факторы [3, 4]. Установлено, что повышенный индекс ФДС часто связан с недостаточным содержанием в созревающих мужских половых клетках специальных нуклеопротеидных белков – протаминов, защищающих молекулу ДНК от внешних повреждений [2].

Последние 3 года (2020–2022 гг.) ознаменованы пандемией коронавирусной инфекции COVID-19 и сопутствующим проведением массовой вакцинации населения. В России с этой целью широко используется отечественный препарат Гам-КОВИД-Вак (Спутник V), разработанный в Национальном исследовательском центре эпидемиологии и микробиологии им. Н.Ф. Гамалеи [5, 6]. В настоящее время по всему миру проводят пост-регистрационные исследования вакцин против вируса

SARS-CoV-2 в целях дополнительного сбора данных о безопасности используемых препаратов, в том числе об их влиянии на репродуктивную систему, гаметогенез и фертильность у человека.

Целью настоящего исследования является анализ показателей спермограмм и ФДС у мужчин после вакцинации препаратом Гам-КОВИД-Вак (Спутник V).

Материалы и методы

Проведен ретроспективный и проспективный анализ данных стандартного спермиологического исследования и индекса ФДС у 122 мужчин репродуктивного возраста. Пациенты обследованы в лаборатории генетики нарушений репродукции ФГБНУ «Медико-генетический научный центр им. акад. Н.П. Бочкова» в период с 2020 по 2022 г. Причины обращения пациентов в лабораторию: бесплодие в браке (85 человек), наличие привычного невынашивания беременности у партнерши в анамнезе (29 человек), планирование беременности (8 человек). На момент обследования его участники не имели в анамнезе коронавирусной инфекции COVID-19. У всех обследованных индивидуумов получено письменное добровольное информированное согласие на проведение данного исследования, одобренное биоэтическим комитетом при ФГБНУ «Медико-генетический научный центр им. акад. Н.П. Бочкова».

Стандартное спермиологическое исследование выполняли в соответствии с рекомендациями лабораторного Руководства Всемирной организации здравоохранения (2010) [7]. При анализе данных спермограмм оценивали средние значения общего количества сперматозоидов в эякуляте (млн), среднее количество (%) сперматозоидов с прогрессивно поступательной подвижностью (progressive motility, PR), количество (%) морфологически нормальных и аномальных (атипичных) сперматозоидов. Дополнительно рассчитывали количество гамет с аномалиями головки, вычисляя долю (%) сперматозоидов с атипичными головками как от общего количества сперматозоидов, так и от всех морфологически аномальных сперматозоидов.

Количество (%) сперматозоидов с фрагментированной ДНК оценивали методом флуоресцентного мечения одно- и двуниевых разрывов ДНК (terminal deoxynucleotid transferase-mediated dUTP biotin nick end labeling, TUNEL) в препаратах половых клеток из эякулята. Мазки семенной жидкости наносили на адгезивные стекла HistoBond (Paul Marienfeld, Германия) и обрабатывали реагентом DeadEnd Fluorometric TUNEL System по протоколу изготовителя (Promega, США). Препараты окрашивали красителем DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindole) (Sigma-Aldrich, США). Для прямого подсчета использовали микроскоп Axiovert 200V (Carl Zeiss, Германия). Рассчитывали индекс ФДС — долю (%) сперматозоидов с фрагментированной ДНК по отношению к общему количеству

сперматозоидов в образце. Повышенным считали количество сперматозоидов с фрагментированной ДНК более 15 % [8]. Микроскопическое исследование семенной жидкости и определение фрагментации ДНК в сперматозоидах были выполнены в условиях одной лаборатории, специалистами одной научной школы.

На основании данных о вакцинации препаратом Спутник V сформированы 3 группы пациентов. Поскольку цикл сперматогенеза составляет 74 ± 4 дня, среди вакцинированных пациентов выделены 2 группы: в 1-ю группу включены 10 мужчин, срок между полной (2 курса препарата) вакцинацией которых и сдачей эякулята не превышал 75 дней (минимум — 4 дня, максимум — 73 дня, в среднем 24 ± 8 дней); во 2-ю группу — 18 мужчин, срок между вакцинацией которых и сдачей эякулята составил более 75 дней (минимум — 101 день, максимум — 372 дня, в среднем 220 ± 20 дней). Группу сравнения (3-я группа) составили 94 невакцинированных (и не болевших коронавирусной инфекцией) мужчины. Средний возраст в анализируемых группах был близок и составил: в 1-й группе — $34,8 \pm 1,3$ года, во 2-й группе — $37,7 \pm 1,3$ года, в 3-й группе — $36,3 \pm 0,6$ года.

В исследуемую выборку не включали пациентов, перенесших коронавирусную инфекцию COVID-19, а также мужчин с тяжелыми формами патозооспермии (азооспермией, криптозооспермией, олигозооспермией тяжелой степени, тотальной и субтотальной астено-/тератозооспермией), генетически обусловленными формами нарушения фертильности.

В указанных группах сопоставлены уровень ФДС и показатели спермограмм: общее количество сперматозоидов в эякуляте, количество (%) сперматозоидов с прогрессивно поступательной (PR) подвижностью и морфологически нормальных (типичных) мужских гамет, доля (%) сперматозоидов с патологией головки.

При проведении статистического анализа рассчитывали средние значения и стандартные ошибки средних величин. При анализе различий средних значений в исследуемых группах использовали непараметрический критерий Манна–Уитни [9]. Наличие статистически значимых различий между группами определяли, принимая критический уровень значимости (p) равным 0,05.

Результаты

Сперматологические показатели вакцинированных пациентов представлены в табл. 1 (1-я группа) и в табл. 2 (2-я группа). В табл. 3 сопоставлены средние значения показателей эякулята в группах вакцинированных пациентов и в группе сравнения (3-я группа). Показатель общего количества сперматозоидов в 1-й группе составил 265 ± 75 млн, во 2-й группе — 355 ± 67 млн, в 3-й группе — 304 ± 26 млн. Количество прогрессивно подвижных (PR) сперматозоидов в 1-й группе составило $18,5 \pm 1,9$ %, во 2-й группе — $23,2 \pm 3,0$ %, в 3-й группе — $18,2 \pm 1,1$ %. Количество морфологически нормальных

Таблица 1. Показатели эякулята у мужчин, вакцинированных менее чем за 75 дней до сдачи эякулята (1-я группа)

Table 1. Ejaculate characteristics in men vaccinated less than 75 days prior to ejaculate sampling (group 1)

Пациент № Patient No.	Возраст, лет Age, year	Количество сперматозоидов с разрывами ДНК, % Number of sperm with DNA damage, %	Количество сперматозоидов с патологией головки, % Number of sperm with head pathologies, %	Общее коли- чество спермато- зоидов, млн Total sperm count, million	Количество прогрессивно подвижных (PR) сперматозоидов, % Progressively motile (PR) sperm, %	Количество мор- фологически нормальных (типичных) сперматозоидов, % Morphologically normal sperm, %
1	36	14,7	28 [26,3]	123	20	6
2	33	17,4	40 [38,4]	94	21	4
3	36	4,6	30 [28,5]	340	24	5
4	30	12,8	53 [51,4]	50	14	3
5	43	31,4	40 [38,8]	135	10	3
6	31	8	36 [34,2]	188	28	5
7	36	12,3	35 [33,6]	848	19	4
8	31	8,2	40 [39,6]	387	10	1
9	40	8,9	23 [21,6]	120	24	6
10	32	6,2	55 [53,4]	366	15	3
Среднее значение Average value	34,8 ± 1,3	12,5 ± 2,4	38,0 ± 3,2 [36,6 ± 3,2]	265 ± 75	18,5 ± 1,9	4,0 ± 0,5

Примечание. Полужирным шрифтом выделены данные пациентов, у которых индекс фрагментации ДНК превышает референсное значение в 15 %. В столбце 4 в квадратных скобках показан процент атипичии головок в атипичных сперматозоидах.
Note. Data of patients with DNA fragmentation index above the reference value of 15 % are shown in bold. Atypical head percentage in atypical sperm is presented in square brackets in column 4.

сперматозоидов в 1-й группе составило $4,0 \pm 0,5$ %, во 2-й группе — $5,8 \pm 0,9$ %, в 3-й группе — $4,1 \pm 0,3$ %. Таким образом, наилучшие показатели эякулята отмечены у мужчин 2-й группы. Статистически значимых различий ни по одному из показателей не выявлено, однако различие между группой сравнения и 2-й группой по количеству морфологически нормальных сперматозоидов близко к достоверному ($p = 0,06$).

В табл. 4 представлены имеющиеся данные по изменению морфологии сперматозоидов у 14 мужчин из 2-й группы до и после прохождения процедуры вакцинации. В среднем количество морфологически нормальных сперматозоидов после вакцинации было большим ($5,6 \pm 1,2$ %), чем до вакцинации ($4,9 \pm 1,0$ %), что косвенно подтверждает отмеченные различия между 2-й группой и группой сравнения.

Содержание сперматозоидов с фрагментированной ядерной ДНК в группах пациентов отражено на рис. 1. Количество сперматозоидов с фрагментированной ДНК (индекс ФДС) варьировало в образцах эякулята в 1-й группе от 4,6 до 31,4 %, во 2-й группе — от 0,8 до 36,5 %

и в 3-й группе — от 1,3 до 39,8 %. Сопоставление аппроксимационных кривых для индекса ФДС у пациентов исследованных групп демонстрирует небольшое повышение количества гамет с фрагментированной ДНК в 1-й группе (срок между вакцинацией и сдачей эякулята менее 75 дней) по сравнению со 2-й и 3-й группами, при этом указанные изменения наблюдаются в области низких значений индекса ФДС (не превышающих 15 %, т. е. находящихся в пределах референсных значений).

В 1-й группе повышенный индекс ФДС (17,4 и 31,4 %) отмечен у 2 из 10 мужчин, что составило 20 % обследованных индивидуумов данной группы. При этом у одного из пациентов повышенный индекс ФДС отмечен и до проведения вакцинации (до вакцинации — 18 %, после — 17,4 %), у другого пациента исследование ФДС до вакцинации не выполняли. Во 2-й группе повышенный индекс ФДС (22,3; 36,5; 15,9 и 15,3 %) отмечен у 4 мужчин (22 % обследованных пациентов данной группы), при этом у 2 мужчин индекс ФДС был повышенным и до вакцинации (в одном случае 37,6 % до вакцинации и 22,3 % после; во втором случае — 22,3

Таблица 2. Показатели эякулята у мужчин, вакцинированных более чем за 75 дней до сдачи эякулята (2-я группа)

Table 2. Ejaculate characteristics in men vaccinated more than 75 days prior to ejaculate sampling (group 2)

Пациент № Patient No.	Возраст, лет Age, year	Количество сперматозо- идов с разры- вами ДНК, % Number of sperm with DNA damage, %	Количество сперматозо- идов с патоло- гией головки, % Number of sperm with head pathologies, %	Общее количество сперматозоидов, млн Total sperm count, million	Количество про- грессивно подвижных (PR) сперматозо- идов, % Progressively motile (PR) sperm, %	Количество мор- фологически нормальных (типичных) сперматозо- идов, % Morphologically normal sperm, %
1	39	11,3	32 [29,1]	243	26	9
2	38	12,7	36 [33,1]	350	26	8
3	42	7,3	27 [25,4]	945	27	6
4	44	4,2	38 [35,3]	558	39	7
5	42	11,6	35 [34,3]	457	13	2
6	35	9,1	40 [37,6]	224	40	6
7	36	4,4	37 [34,0]	66	43	8
8	33	3,4	29 [27,8]	31	11	4
9	35	0,8	33 [31,0]	386	21	6
10	42	6,6	38 [37,2]	413	19	2
11	37	6,2	19 [18,8]	392	17	1
12	32	22,3	19 [17,5]	168	21	8
13	41	14,3	55 [53,9]	348	6	2
14	40	36,5	31 [31]	0,9	4	0
15	33	4,4	23 [20,5]	310	41	11
16	31	9,5	29 [24,9]	1056	24	14
17	29	15,9	23 [21,2]	377	35	8
18	50	15,3	32 [31,4]	65	5	2
Среднее значение Average value	37,7 ± 1,3	10,9 ± 2,0	32,0 ± 2,0 [30,2 ± 2,0]	355 ± 67	23,2 ± 3,0	5,8 ± 0,9

Примечание. Полужирным шрифтом выделены данные пациентов, у которых индекс фрагментации ДНК превышает референсное значение в 15 %. В столбце 4 в квадратных скобках показан процент атипичи головок в атипичных сперматозоидах.

Note. Data of patients with DNA fragmentation index above the reference value of 15 % are shown in bold. Atypical head percentage in atypical sperm is presented in square brackets in column 4.

и 36,5 % соответственно), а у третьего превысил референсное значение после вакцинации (до — 13,4 %, после — 15,9 %). У 4-го пациента до вакцинации исследование ФДС не выполняли. В 3-й группе (сравнения) повышенное количество гамет с фрагментацией ДНК выявлено у 17 (18 %) из 94 пациентов. Отмечено увеличение среднего количества сперматозоидов с разрывами ДНК (индекс ФДС, %) в 1-й группе ($12,5 \pm 2,4$ %)

по сравнению со 2-й ($10,9 \pm 2,0$ %) и 3-й ($10,5 \pm 0,7$ %) группами, однако различия не являются статистически значимыми ($p > 0,05$) (см. табл. 3). Таким образом, доля пациентов с повышенным индексом ФДС максимальна в 1-й группе, но в целом во всех 3 группах схожа, особенно во 2-й и 3-й группах.

Поскольку на параметры эякулята у пациентов может влиять срок давности после проведения вакци-

Таблица 3. Средние значения показателей эякулята у вакцинированных (1-я и 2-я группы) и невакцинированных мужчин (3-я группа)

Table 3. Mean values of semen analysis in vaccinated (groups 1 and 2) and unvaccinated (group 3) men

Группа Group	Возраст, лет Age, year	Количество сперматозоидов с разрывами ДНК, % Number of sperm with DNA damage, %	Количество сперматозоидов с патологией головки, % Number of sperm with head pathologies, %	Общее количество спермато- зоидов, млн Total sperm count, million	Количество прогрессивно подвижных (PR) сперматозо- идов, % Progressively motile (PR) sperm, %	Количество морфологически нормальных (типичных) сперматозо- идов, % Morphologically normal sperm, %
1-я группа (n = 10) Group 1 (n = 10)	34,8 ± 1,3	12,5 ± 2,4 ¹	38,0 ± 3,2 ² [36,6 ± 3,2] ¹²	265 ± 75 ³	18,5 ± 1,9 ⁴	4,0 ± 0,5 ⁵
2-я группа (n = 18) Group 2 (n = 18)	37,7 ± 1,3	10,9 ± 2,0 ⁶	32,0 ± 2,0 ⁷ [30,2 ± 2,0] ¹⁷	355 ± 67 ⁸	23,2 ± 3,0 ⁹	5,8 ± 0,9 ¹⁰
3-я группа (n = 94) Group 3 (n = 94)	36,3 ± 0,6	10,5 ± 0,7	36,9 ± 1,1 [35,4 ± 1,1]	304 ± 26	18,2 ± 1,1	4,1 ± 0,3

Примечание. Уровень значимости различий при сравнении 1-й и 2-й групп с 3-й группой (сравнения): ¹p = 0,34; ²p = 0,76; ¹²p = 0,79; ³p = 0,58; ⁴p = 0,83; ⁵p = 0,62; ⁶p = 0,97; ⁷p = 0,06; ¹⁷p = 0,04; ⁸p = 0,40; ⁹p = 0,13; ¹⁰p = 0,06. В столбце 4 в квадратных скобках показан процент атипичии головок в атипичных сперматозоидах.

Note. Significance level for differences of the groups 1 and 2 with the group 3 (control): ¹p = 0,34; ²p = 0,76; ¹²p = 0,79; ³p = 0,58; ⁴p = 0,83; ⁵p = 0,62; ⁶p = 0,97; ⁷p = 0,06; ¹⁷p = 0,04; ⁸p = 0,40; ⁹p = 0,13; ¹⁰p = 0,06. Atypical head percentage in atypical sperm is presented in square brackets in column 4.

Таблица 4. Количество морфологически нормальных (типичных) сперматозоидов (%) у мужчин из 2-й группы до и после вакцинации

Table 4. Number of morphologically normal (typical) sperm (%) in men from the group 2 before and after vaccination

Пациент № Patient No.	До вакцинации Before vaccination	После вакцинации After vaccination
1	3	9
2	7	8
5	1	2
7	6	8
8	2	4
10	8	2
11	5	1
12	2	8
13	12	2
14	3	0
15	8	11
16	1	14
17	10	8
18	1	2
Среднее значение Average value	4,9 ± 1,0	5,6 ± 1,2

Примечание. Номера пациентов соответствуют таковым в табл. 2. Полужирным шрифтом выделены данные пациентов, у которых количество типичных сперматозоидов после вакцинации уступает аналогичному показателю до вакцинации.

Note. Numbers correspond to the numbers in Table 2. Values that appeared to be worse after vaccination are shown in bold.

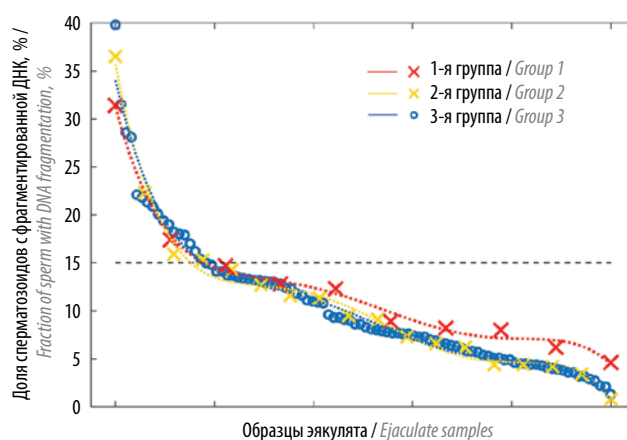


Рис. 1. Количество (%) сперматозоидов с фрагментированной ДНК в исследованных группах. Каждая точка (кружок или крестик) на графике соответствует отдельному образцу эякулята. Черная горизонтальная пунктирная линия показывает верхнюю границу референсного значения индекса фрагментации ДНК в сперматозоидах (15%), цветные линии — аппроксимация данных полиномами 5-й степени

Fig. 1. Number (%) of sperm with DNA fragmentation in the studied groups. Every point (circle or cross) on the plot corresponds to an ejaculate sample. Black horizontal dashed line shows the upper limit of reference DNA fragmentation index (15%), colored lines show approximation with 5th degree polynomials

нации, нами исследована зависимость уровня ФДС от временного интервала после вакцинирования, в том числе у 5 пациентов, у которых исследование целостности хроматина в сперматозоидах выполнено как до, так и после вакцинации (рис. 2). Не обнаружено значимой зависимости количества гамет с разрывами молекул ДНК от проведения вакцинации и от срока после ее выполнения.

Так как нарушение хроматина может спрово-

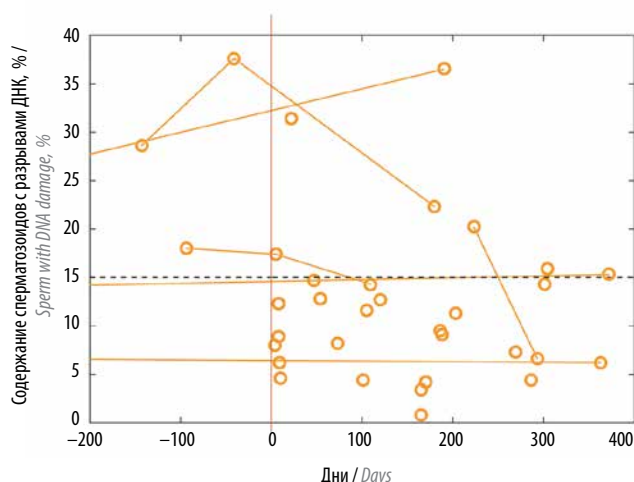


Рис. 2. Индекс фрагментации ДНК в сперматозоидах (ФДС) у пациентов в зависимости от временного интервала (в днях) между вакцинацией и проведением исследования. За 0-й день взята дата полной вакцинации. Каждая точка на графике соответствует отдельному пациенту. Линиями соединены значения индекса ФДС у пациентов, обследованных неоднократно. Пунктирной черной линией показано критическое значение индекса ФДС, превышение которого считается отклонением от нормы. Данные сроком более 1 года до момента вакцинации на рисунке не показаны

Fig. 2. Sperm DNA fragmentation index (DFI) in patients depending on time (in days) between vaccination and ejaculate study. Day 0 corresponds to the day of full vaccination. Each point on the plot corresponds to a single patient. Lines link DFI values in patients who were examined multiple times. Dashed black line shows critical DFI value above which DFI is considered abnormal. Data older than 1 year prior to vaccination is not shown

ждаться аномалиями формы головки, выполнено исследование возможной связи между индексом ФДС и количеством (%) сперматозоидов с морфологическими аномалиями головки. Доля сперматозоидов с патологией головки в 1-й группе составила $38,0 \pm 3,2 \%$, во 2-й группе — $32,0 \pm 2,0 \%$, в 3-й группе — $36,9 \pm 1,1 \%$. Процент атипичии головок в атипичных сперматозоидах составил: в 1-й группе — $36,6 \pm 3,2 \%$, во 2-й группе — $30,2 \pm 2,0 \%$, в 3-й группе — $35,4 \pm 1,1 \%$; различия между 2-й и 3-й группами статистически значимы ($p = 0,04$). Среди вакцинированных мужчин не выявлено повышенной частоты атипичии головок сперматозоидов (рис. 3). Высокая (30 % и более) частота аномалий головки в сперматозоидах отмечена среди

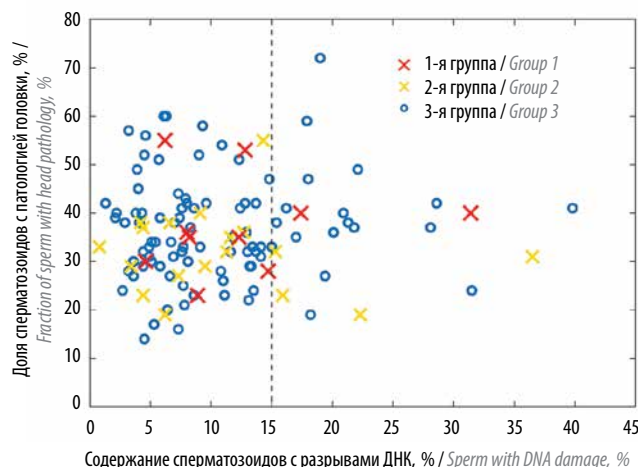


Рис. 3. Количество (%) сперматозоидов с морфологическими аномалиями головки в образцах эякулята исследованных групп. Каждая точка на графике соответствует отдельному образцу эякулята. Вертикальная пунктирная линия показывает верхнюю границу референсного значения индекса фрагментации ДНК в сперматозоидах (15 %)

Fig. 3. Number (%) of sperm with head pathologies in ejaculate samples of the studied groups. Every point on the plot corresponds to an ejaculate sample. Vertical dashed line shows the upper limit of reference DNA fragmentation index (15 %)

пациентов как с высоким (более 15 %), так и низким показателем фрагментации ДНК в гаметах.

Обсуждение

К настоящему времени возможность негативного влияния вакцинирования против вируса SARS-CoV-2 на мужскую фертильность оценивалась только на основании данных об основных параметрах семенной жидкости, при этом не исследовалось влияние на функциональные характеристики и ультраструктуру сперматозоидов, частоту анеуплоидии, состояние хроматина, фрагментацию ДНК и мембранный потенциал митохондрий мужских гамет [10].

В научной литературе имеются единичные работы по оценке целостности наследственного материала в мужских половых клетках у вакцинированных мужчин и у пациентов после коронавирусной инфекции SARS-CoV-2 (COVID-19), при этом выполнены они на небольших выборках пациентов [11–14]. В работе J. Maryouf и соавт. [12] показано увеличение индекса ФДС (с 29 до 79 %) у пациента 45 лет со вторичным бесплодием после перенесенного заболевания COVID-19. В работе L. Ma и соавт., выполненной на выборке из 12 мужчин, перенесших коронавирусную инфекцию, показано увеличение количества сперматозоидов с фрагментированной ДНК у 4 (33 %) мужчин [13]. В нашей недавней работе [14] на основании данных 130 переболевших пациентов показано увеличение индекса ФДС после заболевания с последующим восстановлением (в срок более 75 дней) до показателей контрольной группы.

К. Chatzimeletiou и соавт. [15] описали результаты серии обследований (в динамике) 43-летнего мужчины с анкилозирующим спондилитом, вакцинированного мРНК коронавируса. Обследования проводили в связи с бесплодием в браке и неудачными исходами программы внутриматочной инсеминации у супруги. Помимо спермиологического исследования пациенту было выполнено электронно-микроскопическое исследование сперматозоидов и анализ ФДС методом проточной цитофлуориметрии. В связи с заболеванием пациент принимал анти-TNF- α препарат (Golimumab). По данным сперматологического обследования у него диагностирована нормозооспермия, впоследствии – тератозооспермия (до лечения – 9 % морфологически нормальных гамет, после лечения – 1 %). До вакцинации и начала лечения индекс ФДС составил 9,6 %, на фоне лечения до вакцинации – 7,6 %, после 3 доз вакцины – 6,8 %. По данным электронно-микроскопического исследования сперматозоидов у пациента выявлены различные аномалии (головки, акросомы, шейки и жгутика сперматозоидов), отмечено повышение количества удлинённых головок после лечения препаратом Golimumab, что, вероятно, связано с побочным действием препарата на сперматогенез. В результате проведенного лечения у супруги пациента наступили 2 беременности естественным путем, которые закончились рождением 2 здоровых детей.

Результаты анализа уровня ФДС прямым методом TUNEL в выборке обследованных нами пациентов свидетельствуют об отсутствии значимого влияния вакцинации препаратом Гам-КОВИД-Вак (Спутник V) на целостность наследственного материала в сперматозоидах. Наблюдаемое превышение среднего значения индекса ФДС в 1-й группе пациентов (обследованных в срок менее 75 дней после вакцинации) по сравнению со 2-й группой и 3-й группой (сравнения), обусловлено значениями, не выходящими за пределы референсных – 15 % (см. рис. 1). В срок более 75 дней после вакцинации показатели фрагментации значимо не отличались от контрольных. Сравнение индекса ФДС у одних и тех же пациентов до и после вакцинации также не демонстрирует существенного изменения данного сперматологического показателя в динамике. Наблюдаемая ситуация отличается от проведенного нами ранее исследования о влиянии перенесенной инфекции COVID-19 на фрагментацию ДНК в сперматозоидах [14], в котором у части пациентов было

выявлено существенное превышение референсных значений количества мужских гамет с нарушением целостности хроматина в образцах эякулята, полученных вскоре после реконвалесценции.

Статистически значимых различий в показателях спермограмм в группах вакцинированных пациентов и в группе сравнения не выявлено, что соответствует результатам нашей предыдущей работы [16], проведенной на более крупной выборке пациентов. При этом отмечено улучшение качества спермы у мужчин, обследованных в срок более 75 дней после проведения вакцинации, особенно по количеству морфологически нормальных сперматозоидов. Частота (%) гамет с атипией головки среди морфологически аномальных сперматозоидов у вакцинированных мужчин статистически значимо ниже аналогичного показателя у мужчин из группы сравнения.

Следует отметить, что некоторое улучшение качества спермы после вакцинации было показано ранее и для препаратов на основе мРНК коронавируса SARS-CoV-2 [10]. При исследовании образцов эякулята от 33 мужчин-доноров выявлено увеличение общего количества сперматозоидов и общего количество подвижных сперматозоидов после проведения вакцинации препаратом Pfizer (BNT162b) при неизменной доле подвижных сперматозоидов [17]. Аналогичные выводы сделаны и другими исследовательскими группами [18, 19]. D. Lifshitz и соавт. [18] оценили влияние вакцины Pfizer на выборке из 75 мужчин с доказанной фертильностью. В 74 из 75 исследованных образцов эякулята, полученных после вакцинации, сперматологические показатели превышали 5-е процентиля референсных значений для концентрации сперматозоидов, их прогрессивной подвижности, общего количества подвижных клеток и доли морфологически нормальных гамет, приведенных в лабораторном руководстве Всемирной организации здравоохранения. D.C. Gonzalez и соавт. [19] не обнаружили существенного снижения параметров спермы у 45 здоровых мужчин после вакцинации препаратами на основе мРНК (Pfizer ($n = 21$) и Moderna ($n = 24$)).

Заключение

В представленном исследовании значимых различий в уровне ФДС у вакцинированных и невакцинированных мужчин не выявлено. Полученные результаты свидетельствуют о безопасности аденовирусной вакцины Спутник V для репродуктивного здоровья мужчин.

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

- Agarwal A., Said T.M. Role of sperm chromatin abnormalities and DNA damage in male infertility. *Hum Reprod Update* 2003;9(4):331–45. DOI: 10.1093/humupd/dmg027
- Simon L., Castillo J., Oliva R., Lewis S.E. Relationships between human sperm protamines, DNA damage and assisted reproduction outcomes. *Reprod Biomed Online* 2011;23(6):724–34. DOI: 10.1016/j.rbmo.2011.08.010
- Muratori M., De Geyter C. Chromatin condensation, fragmentation of DNA and differences in the epigenetic signature of infertile men. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab* 2019;33(1): 117–26. DOI: 10.1016/j.beem.2018.10.004
- Muratori M., Tamburrino L., Marchiani S. et al. Investigation on the origin of sperm DNA fragmentation: role of apoptosis, immaturity and oxidative stress. *Mol Med* 2015;21:109–22. DOI: 10.2119/molmed.2014.00158
- Logunov D.Y., Dolzhikova I.V., Zubkova O.V. et al. Safety and immunogenicity of an rAd26 and rAd5 vector-based heterologous prime-boost COVID-19 vaccine in two formulations: two open, non-randomised phase 1/2 studies from Russia. *Lancet* 2020;396(10255):887–97. DOI: 10.1016/S0140-6736(20)31866-3
- Logunov D.Y., Dolzhikova I.V., Shcheblyakov D.V. et al. Safety and efficacy of an rAd26 and rAd5 vector-based heterologous prime-boost COVID-19 vaccine: an interim analysis of a randomised controlled phase 3 trial in Russia. *Lancet* 2021;397(10275):671–81. DOI: 10.1016/S0140-6736(21)00234-8
- WHO laboratory manual for the Examination and processing of human semen. 5th edn. WHO, 2010.
- Хаят С.Ш., Брагина Е.Е., Арифалин Е.А. и др. Фрагментация ДНК сперматозоидов у мужчин разного возраста. *Андрология и генитальная хирургия* 2019;20(4):39–44. DOI: 10.17650/2070-9781-2019-20-4-39-44
- Khayat S.S., Bragina E.E., Arifulin E.A. et al. Sperm DNA fragmentation in men of different age. *Andrologiya i genital'naya khirurgiya = Andrology and Genital Surgery* 2019;20(4):39–44. (In Russ.). DOI: 10.17650/2070-9781-2019-20-4-39-44
- Грибовский А.М. Анализ количественных данных для двух независимых групп. *Экология человека* 2008;(2):54–61. Grzybowski A.M. Analysis of quantitative data for two independent groups. *Ekologiya cheloveka = Human Ecology* 2008;(2): 54–61.
- Cardona Maya W.D., Omolayo T.S., du Plessis S.S. Re: The impact of COVID-19 vaccine on sperm quality. *Eur Urol* 2022 Sep;82(3):327–8. DOI: 10.1016/j.eururo.2022.06.021
- Omolayo T.S., Adeniji A.A., Cardona Maya W.D., du Plessis S.S. SARS-COV-2 (COVID-19) and male fertility: where are we? *Reprod Toxicol* 2021;99:65–70. DOI: 10.1016/j.reprotox.2020.11.012
- Maryousef J., Alkandari M.H., Zini A. Case – Sperm DNA fragmentation associated with COVID-19 infection. *Can Urol Assoc J* 2022;16(5):E301–E3. DOI: 10.5489/cuaj.7721
- Ma L., Xie W., Li D. et al. Evaluation of sex-related hormones and semen characteristics in reproductive-aged male COVID-19 patients. *J Med Virol* 2021;93(1):456–62. DOI: 10.1002/jmv.26259
- Сорокина Т.М., Брагина Е.Е., Сорокина Е.А. и др. Исследование влияния инфекции COVID-19 на фрагментацию ДНК в сперматозоидах. *Андрология и генитальная хирургия* 2022; 23(3):72–84. DOI: 10.17650/2070-9781-2022-23-3-72-84
- Sorokina T.M., Bragina E.E., Sorokina E.A. et al. Investigation of the effect of COVID-19 infection on sperm DNA fragmentation. *Andrologiya i genital'naya khirurgiya = Andrology and Genital Surgery* 2022;23(3):72–84. (In Russ.). DOI: 10.17650/2070-9781-2022-23-3-72-84
- Chatzimeletiou K., Fleva A., Sioga A. et al. Effects of different drug therapies and COVID-19 mRNA vaccination on semen quality in a man with ankylosing spondylitis: a case report. *Medicina (Kaunas)* 2022;58(2):173. DOI: 10.3390/medicina58020173.
- Сорокина Т.М., Брагина Е.Е., Сорокина Е.А. и др. Оценка и сравнительный анализ спермиологических показателей у мужчин до и после вакцинации препаратом «Спутник V» (Гам-КОВИД-Вак). *Андрология и генитальная хирургия* 2021;22(4): 45–53. DOI: 10.17650/1726-9784-2021-22-4-45-53
- Sorokina T.M., Bragina E.E., Sorokina E.A. et al. Evaluation and comparative analysis of sperm characteristics in men before and after vaccination with Sputnik V (Gam-COVID-Vac). *Andrologiya i genital'naya khirurgiya = Andrology and Genital Surgery* 2021;22(4):45–53. (In Russ.). DOI: 10.17650/1726-9784-2021-22-4-45-53
- Barda S., Laskov I., Grisaru D. et al. The impact of COVID-19 vaccine on sperm quality. *Int J Gynaecol Obstet* 2022 Jul;158(1):116–20. DOI: 10.1002/ijgo.14135
- Lifshitz D., Haas J., Lebovitz O. et al. Does mRNA SARS-CoV-2 vaccine detrimentally affect male fertility, as reflected by semen analysis? *Reprod Biomed Online* 2022;44(1):145–9. DOI: 10.1016/j.rbmo.2021.09.021
- Gonzalez D.C., Nassau D.E., Khodamoradi K. et al. Sperm parameters before and after COVID-19 mRNA vaccination. *JAMA* 2021;326(3):273–4. DOI: 10.1001/jama.2021.9976

Вклад авторов

Т.М. Сорокина: разработка дизайна исследования, клиническое обследование пациентов, анализ полученных данных, обзор публикаций по теме статьи, написание текста статьи;
Е.Е. Брагина: обзор публикаций по теме статьи, написание текста статьи;
Е.А. Сорокина: разработка дизайна исследования, анализ полученных данных, написание текста статьи;
Л.Ф. Курило: редактирование текста статьи;
М.И. Штаут, А.О. Седова: выполнение спермиологических исследований, редактирование текста статьи;
В.Б. Черных: разработка дизайна исследования, клиническое обследование пациентов, анализ данных, написание и редактирование текста статьи.

Authors' contributions

T.M. Sorokina: research design development, clinical examination of patients, data analysis, review of publications on the topic of the article, article writing;
E.E. Bragina: review of publications on the topic of the article, article writing;
E.A. Sorokina: research design development, analysis of the received data, editing of the article text;
L.F. Kurilo: editing the text of the article;
M.I. Shtaut, A.O. Sedova: semen analysis, editing of the article text;
V.B. Chernykh: research design development, clinical examination of patients, analysis of the received data, writing and editing of the article.



ORCID авторов / ORCID of authors

Т.М. Сорокина / T.M. Sorokina: <https://orcid.org/0000-0002-4618-2466>

Е.Е. Брагина / E.E. Bragina: <https://orcid.org/0000-0002-8422-4962>

Е.А. Сорокина / E.A. Sorokina: <https://orcid.org/0000-0002-2735-6918>

А.О. Седова / A.O. Sedova: <https://orcid.org/0000-0002-7032-0793>

М.И. Штаут / M.I. Shtaut: <https://orcid.org/0000-0002-0580-5575>

Л.Ф. Курило / L.F. Kurilo: <https://orcid.org/0000-0003-3603-4838>

В.Б. Черных / V.B. Chernykh: <https://orcid.org/0000-0002-7615-8512>

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

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

Финансирование. Работа выполнена в рамках государственного задания Министерства науки и высшего образования Российской Федерации.

Funding. The study was carried out within the framework of the state task of the Ministry of Science and Higher Education of the Russian Federation.

Соблюдение прав пациентов. Исследование одобрено биоэтическим комитетом при ФГБНУ «Медико-генетический научный центр им. акад. Н.П. Бочкова». Все пациенты подписали информированное согласие на участие в исследовании.

Compliance with patient rights. The study was approved by the Bioethical Committee at the N.P. Bochkov Research Centre for Medical Genetics. All patients gave written informed consent to participate in the study.