

Копийность митохондриальной ДНК в сперматозоидах и мужская фертильность

Хаят С.Ш., Курило Л.Ф., Черных В.Б.

ФГБНУ «Медико-генетический научный центр имени академика Н.П. Бочкова»
115522, г. Москва, ул. Москворечье, д. 1

В настоящее время изучение митохондриального генома в мужских и женских половых клетках является одной из активно исследуемых областей в репродуктивной генетике. Ряд авторов свидетельствует о наличии связи между копийностью мтДНК, качеством гамет и фертильным потенциалом. Мужская фертильность в значительной мере зависит от параметров семенной жидкости, в частности, от количества и качества сперматозоидов, на которые влияет множество генетических и негенетических факторов. Одними из факторов снижения подвижности сперматозоидов являются нарушение функции митохондрий, изменения митохондриальной ДНК (мтДНК) в мужских половых клетках. В данной статье представлен краткий обзор исследований, связанных с содержанием митохондриальной ДНК в сперматозоидах в норме и при различных формах патозооспермии.

Ключевые слова: митохондрии, митохондриальная ДНК (мтДНК), сперматогенез, половые клетки, фертильность, патозооспермия.

Для цитирования: Хаят С.Ш., Курило Л.Ф., Черных В.Б. Копийность митохондриальной ДНК в сперматозоидах и мужская фертильность. *Медицинская генетика* 2023; 22(12): 45-51.

Автор для корреспонденции: Черных В.Б.; **e-mail:** chernykh@med-gen.ru

Финансирование. Работа выполнена в рамках государственного задания Минобрнауки России для ФГБНУ «МГНЦ».

Конфликт интересов: Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Поступила: 03.11.2023

Sperm mitochondrial DNA copy number and male fertility

Khayat S.Sh., Kurilo L.F., Chernykh V.B.

Research Centre for Medical Genetics
1, Moskvorechie st., Moscow, 115478, Russian Federation

Currently, the study of mitochondrial genome in male and female gametes is one of the actively investigated topics in reproductive genetics. A number of authors argue that there is an association between mtDNA copy number, quality of gametes, and fertility potential. Male fertility depends on a large extent on seminal fluid parameters, in particular on the quantity and quality of spermatozoa, which are influenced by many genetic and non-genetic factors. Some of the genetic factors of decreased sperm motility are mitochondrial dysfunction, mitochondrial DNA (mtDNA) abnormalities in male germ cells. This article presents a brief review of the results of studies related to the mitochondrial DNA content in normal sperm parameters and various forms of pathozoospermia.

Keywords: mitochondria, mitochondrial DNA (mtDNA), spermatogenesis, germ cells, fertility, pathozoospermia.

For citation: Khayat S.Sh., Kurilo L.F., Chernykh V.B. Sperm mitochondrial DNA copy number and male fertility. *Medical genetics [Medicinskaya genetika]*. 2023; 22(12): 45-51. (In Russ.)

Corresponding author: Chernykh V.B.; **e-mail:** chernykh@med-gen.ru

Funding. The study has been funded by the state assignment of the Ministry of Science and Higher Education of the Russian Federation.

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

Accepted: 03.11.2023

Введение

В большинстве случаев снижение фертильности мужчин связано с нарушением сперматогенеза, снижением количественных показателей и/или функциональных характеристик сперматозоидов. Многочисленность форм мужского бесплодия, разнообразие их этиологии и патогенетических механизмов, приводящих к снижению количества, подвиж-

ности и морфологии сперматозоидов, требуют комплексного подхода к их исследованию. Одним из факторов снижения подвижности сперматозоидов является нарушение функции митохондрий и состояние их генома в мужских гаметах. В большинстве генетических исследований половых клеток анализируют ядерную ДНК, поэтому одна из областей генетиче-

ских исследований в репродуктивной медицине, которую до недавнего времени практически не учитывали, — это роль митохондрий и митохондриальной ДНК (мтДНК).

Митохондрии играют ключевую роль в сперматозоидах, обеспечивая энергию для двигательной активности жгутиков и других функций и процессов, таких как капацитация, гиперактивация, акросомная реакция и проникновение в ооцит, что, в свою очередь, определяет способность мужских гамет к оплодотворению.

В ходе сперматогенеза происходят существенные изменения формы и структурной организации митохондрий. Сперматогонии и ранние сперматоциты несут митохондрии сферической формы, далее они удлиняются и фрагментируются в гаплоидных округлых сперматидях. Большая часть цитоплазмы, содержащей митохондрии, удаляется в ходе спермиогенеза, а оставшиеся 80–100 митохондрий плотно укладываются по спирали вокруг среднего отдела жгутика развивающегося сперматозоида. Эти органеллы занимают значительную часть общего клеточного объема (около 15–22 %) [1].

Особенности митохондриального генома в мужских половых клетках

Митохондриальный геном человека составляет около 1% от общего содержания ДНК в клетке и организован в суперспирализованную кольцевую двухцепочечную молекулу ДНК [2] размером 16569 пар нуклеотидов (п.н.), которая ассоциирована с внутренней мембраной митохондрии. В структурной организации мтДНК выделяют контрольный (некодирующий) регион и кодирующий регион. Контрольный регион является наиболее изменчивой частью митохондриального генома. Контрольный регион, протяженная некодирующая последовательность, содержит нуклеотидные последовательности, необходимые для инициации и регуляции процессов репликации и транскрипции мтДНК и обеспечивает ассоциацию митохондриальной хромосомы с мембраной органеллы. Кодирующий регион содержит 37 генов, кодирующих 2 рРНК (12S и 16S рРНК), 22 тРНК и 13 полипептидов [3].

Ценность исследований митохондриального генома для генетических исследований складывается из комплекса особенностей мтДНК: материнского характера наследования, отличия от универсального генетического кода, отсутствия рекомбинации, высокой скорости накопления мутаций. Эти уникальные особенности во многом определяют функциональные

последствия патогенных мутаций мтДНК. В отличие от диплоидного ядерного генома, митохондриальный геном представлен несколькими копиями на клетку в зависимости от её типа [4].

В зависимости от типа ткани, антиоксидантного статуса, потребности в энергии и других факторов соматическая клетка может содержать от сотни до тысячи митохондрий [5]. Клетки с высокой потребностью в АТФ, такие как кардиомиоциты, имеют около 7000 копий мтДНК на клетку, клетки с низкой потребностью в энергии, такие как клетки селезенки, — около 100 [6–9]. Ооцит человека содержит 100 000 копий мтДНК [10].

В сперматозоиде содержится до 100 копий мтДНК, как минимум в 1000 раз меньше, чем в ооците [11]. По мере созревания сперматозоида количество митохондриальных геномов на гаплоидный геном уменьшается в 8–10 раз. Как правило, в других типах тканей снижение копийности мтДНК приводит к различным многофакторным заболеваниям и патологическим состояниям [12], включая различные формы первичного рака [13], нейродегенеративные изменения [14] и диабет [15]. Это подчеркивает уникальность сперматозоидов, которые, как правило, имеют относительно низкое содержание мтДНК, но при этом полностью функциональные митохондрии. В метаболизме мтДНК участвуют ядерные гены, координирующие количество её копий в зависимости от энергетических потребностей клетки [14]. Многокопийность мтДНК является отличительной особенностью, которая обеспечивает «буферную» устойчивость к изменениям энергетического статуса клетки.

Исследования мтДНК у мужчин с различными параметрами эякулята

Исследования ферментативной активности митохондрий продемонстрировали её корреляцию с жизнеспособностью и подвижностью сперматозоидов [16]. Показано, что митохондрии могут проявлять значительную метаболическую пластичность, которая может быть использована для контроля активации сперматозоидов *in vitro* (капацитации и реакции акросомы) [17]. Так, Ruiz-Pesini с соавт. выявили ассоциацию между гаплогруппами мтДНК и снижением подвижности сперматозоидов у мужчин с бесплодием, в их исследовании астенозооспермия чаще встречалась среди носителей гаплогруппы Т мтДНК [18].

В митохондриальном геноме человека обнаружен ряд делеций размером от 1 до 10 т.п.н. [19]. Для де-

текции протяженных делеций в мтДНК применяют методы лонг-ПЦР (long amplicon PCR — LA-PCR или long extension PCR — LX-PCR), которые позволяют амплифицировать фрагменты 10–15 т.п.н. и более [20, 21]. Важно отметить, что чем короче молекула мтДНК в материале, тем большее преимущество репликации она будет иметь над полноразмерной мтДНК, что может влиять на оценку уровня гетероплазмы. Патогенность протяженных делеций (размером 4866 т.п.н., 4977 т.п.н., 7436 т.п.н., 7599 т.п.н.) связывают с утратой генов тРНК, что приводит к нарушению трансляции митохондриального генома. В литературе обсуждают патогенность частой протяженной делеции размером в 4977 п.н. (Δ mtDNA4977), при которой утрачивается около трети молекулы мтДНК. Данная делеция фланкирована двумя прямыми повторами размером 13 п.н. (положение 8470–8482 и 13447–13459) и полностью или частично удаляет 12 из 37 генов, кодируемых митохондриальным геномом [22].

Результаты исследований на наличие протяженных делеций мтДНК в сперматозоидах у мужчин с нарушением фертильности противоречивы. Так, Као с соавт. продемонстрировали ассоциацию делеции мтДНК 4977 п.н. со снижением подвижности сперматозоидов у пациентов с астенозооспермией [23]. В более поздних работах, напротив, не было обнаружено четкой связи между делецией мтДНК 4977 п.н. и параметрами эякулята [24,25]. В ряде работ также было показано, что множественные делеции мтДНК тесно связаны с нарушением функции сперматозоидов и снижением фертильности у мужчин, и эти мутации митохондриального генома влияют на подвижность сперматозоидов, что может вызывать снижение фертильности [25, 26]. Другие исследователи не выявили такой связи [27]. Причина этого несоответствия может быть связана с феноменом гетероплазмы, когда в одной клетке присутствуют как делетированные, так и интактные молекулы мтДНК, при этом неизвестен порог их патогенности. Также неизвестно при каком проценте гетероплазмы делеция визуализируется при электрофоретическом разделении амплифицированных фрагментов [28].

У пациентов, имеющих делеции митохондриального генома, описана структурная перестройка, в результате которой объединяются интактная молекула мтДНК — 16,6 т.п.н. с молекулой, несущей делецию — 11,6 т.п.н., при этом образуются кольцевые молекулы размером 28,2 т.п.н. [29]. Аналогичные перестройки генома митохондрий, сочетающие делеции с дупликациями, показаны и в других исследованиях [30]. Количество копий мтДНК в клетке определяют относитель-

но ядерного генома. Измерение относительного числа копий мтДНК рассчитывается по отношению уровней флуоресценции продуктов ПЦР гена мтДНК и референсного ядерного гена (например, *GAPDH* или β -актина), полученных методом ПЦР в реальном времени. Кроме того, такой подход позволяет оценить уровень гетероплазмы по мутации мтДНК [31].

Результаты исследований копийности мтДНК в сперматозоидах у мужчин с различными параметрами эякулята приведены в **таблице**. May-Panloup с соавт. исследовали подвижные сперматозоиды, полученные методом градиентного разделения из образцов эякулята с нормальными параметрами сперматозоидов (нормозооспермией) ($n=32$) и образцов эякулята пациентов с патозооспермией ($n=35$). Соотношение генов мтДНК и β -глобина определяли методом количественной ПЦР в реальном времени. Среднее соотношение мтДНК/ β -глобин составило 1,4 в образцах эякулята с нормальными параметрами, 6,1 — в образцах эякулята, в которых хотя бы один критерий (количество, морфология сперматозоидов или их подвижность) был снижен, и 9,1 — в образцах эякулята, имеющих два и более таких критерия [32]. Faja с соавт. продемонстрировали статистически значимое ($p < 0,001$) различие в количестве копий мтДНК между двумя группами пациентов — с нормальной подвижностью сперматозоидов и астенозооспермией ($929,6 \pm 23,3$ и $73,0 \pm 57,6$, соответственно) [5]. Diez-Sanchez с соавт. также показали, что для прогрессивно подвижных и не прогрессивно подвижных сперматозоидов характерно различное соотношение мтДНК и ядерной ДНК [33]. Amaral с соавт, напротив, такой зависимости не выявили, но отметили, что количество копий мтДНК на сперматозоид достоверно увеличивается по мере снижения процента морфологически нормальных сперматозоидов и их концентрации в эякуляте. Так, в группе пациентов с нормозооспермией (контроль) среднее условное количество копий мтДНК на сперматозоид составляло $6,8 \pm 1,8$, в группе с нарушением 1–2 параметров эякулята — $11,3 \pm 4,5$, а в группе с олигоастенотератозооспермией — $46,7 \pm 15,0$ [34]. Song и Lewis выявили отрицательную корреляцию между копийностью мтДНК и общим количеством сперматозоидов в эякуляте ($r = -0,561$; $p < 0,01$). Среднее число копий мтДНК у пациентов с нормозооспермией, астенозооспермией, олигозооспермией и олигоастенотератозооспермией составило 15,7; 34,3; 56,7 и 73,7 [35].

Данные полученные рядом авторов согласуются между собой, в их работах было показано, что копийность мтДНК негативно коррелирует с концентрацией,

количеством и подвижностью сперматозоидов в эякуляте [36–38]. Zhang с соавт. получили сходные результаты на выборке из 386 мужчин в общей популяции, а также отметили, что количество копий мтДНК в сперматозоидах повышается с возрастом пациента [39] (таблица).

Результаты рассмотренных исследований позволяют сделать выводы о влиянии копийности мтДНК на функциональные свойства сперматозоидов. Однако следует отметить, что большая часть работ была проведена на небольших выборках. Не было выполнено комплексного обследования пациентов, не представлены данные цитогенетического исследования. При стандартном анализе эякулята не было выявлено

специфических морфологических нарушений, также не проводили электронно-микроскопическое исследование эякулята.

Следует отметить, что в ряде работ не конкретизировали формы патозооспермии у пациентов, включенных в исследование, оценивали не все основные сперматологические параметры или использовали менее точные методы анализа [32,34,38]. В исследовании Tian с соавт. (2014 года) и Song и Lewis (2008 года) параметры подвижности сперматозоидов определяли с помощью компьютерного анализа эякулята [35,36]. А в исследовании Zhang с соавт. 2016 года с использованием автоматизированного подсчета помимо под-

Таблица. Результаты исследований копийности мтДНК в сперматозоидах у мужчин с различными параметрами эякулята.

Table. Studies of mtDNA copy number in sperm in men with different sperm parameters

Сперматологический диагноз	Результаты исследования	Литературный источник
патозооспермия (n=35) нормозооспермия (n=32)	Среднее соотношение мтДНК/β-глобин составило 1,4 для образцов с нормозооспермией и 6,1 для сперматозоидов из образцов эякулята, имеющих ≥1 аномальный параметр спермограммы	[32]
астенозооспермия (n=255), олигоастенозооспермия (n=105), олигозооспермия (n=7), нормозооспермия (n=73)	Значимая отрицательная корреляция копийности мтДНК с концентрацией, количеством прогрессивно подвижных (PR) сперматозоидов	[33]
нарушение 1-2 параметров эякулята (n=14), олигоастенотератозооспермия (n=14), нормозооспермия (n=14)	Повышенная копийность мтДНК у пациентов с патозооспермией. У пациентов с нормозооспермией количество копий мтДНК на сперматозоид составило $6,8 \pm 1,8$, в группе с нарушением 1-2 параметров эякулята – $11,3 \pm 4,5$, с олигоастенотератозооспермией – $46,7 \pm 15,0$	[34]
астенозооспермия (n=19), олигоастенозооспермия (n=11), олигозооспермия (n=3) нормозооспермия (n=24)	Среднее число копий мтДНК у пациентов с нормозооспермией – 15,7, астенозооспермией – 34,3, олигозооспермией – 56,7 олигоастенотератозооспермией – 73,7. Выявлена повышенная копийность мтДНК у пациентов с патозооспермией. Количество копий мтДНК отрицательно коррелировало с количеством сперматозоидов ($r = -0,561$; $p < 0,01$).	[35]
118 мужчин из супружеских пар с бесплодием с разными показателями спермограмм, в том числе с патозооспермией	Копийность мтДНК отрицательно коррелирует с подвижностью, концентрацией и морфологией сперматозоидов ($p < 0,05$).	[36]
386 пациентов из общей популяции	Копийность мтДНК отрицательно коррелирует с концентрацией ($r = -0,214$; $p < 0,01$), количеством ($r = -0,232$; $p < 0,01$) и подвижностью сперматозоидов ($r = -0,185$; $p < 0,01$)	[39]
астенозооспермия (n=63), нормальная подвижность (n=63)	Статистически значимое различие ($p < 0,001$) по количеству копий мтДНК между группами – $29,6 \pm 23,3$ и $73,0 \pm 57,6$, соответственно	[5]
119 мужчин из супружеских пар, которым делали ЭКО. Возраст (18–55 лет) $36,4 \pm 5,5$ лет. Из них у 32 было мужское бесплодие	Увеличение копийности мтДНК ассоциировано со снижением концентрации, количества, подвижности и морфологически нормальных сперматозоидов ($p \leq 0,03$) Частота оплодотворения меньше у пациентов с большим количеством копий мт ДНК, более низкое качество эмбрионов на 3–5 день развития, соответственно, меньше переносов.	[37]
патозооспермия (n=43), нормозооспермия (n=29)	Количество копий мтДНК на сперматозоид в 3 раза выше в образцах эякулята с патозооспермией (16,06 против 4,99)	[38]

вижности оценивали концентрацию сперматозоидов и общее количество сперматозоидов в эякуляте [39]. Это способ анализа морфокинетических параметров сперматозоидов призван упростить стандартный метод оценки эякулята, но имеет ряд ограничений, таких как возможность получения ложноположительных или ложноотрицательных результатов, а также ошибки в определении кинетических характеристик клеток.

Патогенез изменения копийности мтДНК в половых клетках

Механизм(ы) изменения митохондриального генома, его взаимодействия с ядерным геномом и эпигенетическими изменениями в половых клетках недостаточно изучены. В процессах как сперматогенеза, так и оогенеза происходит изменение копийности мтДНК в половых клетках. Сперматогенез сопровождается значительным уменьшением количества копий мтДНК в созревающих половых клетках. Зрелые сперматозоиды содержат 1-2 копии митохондриального генома на митохондрию [40]. При этом не было выявлено существенных различий в нуклеотидной последовательности мтДНК в незрелых половых клетках разных стадий развития и в сперматозоидах [41]. Показано, что содержание мтДНК как в мужских, так и в женских гаметах связано со степенью их морфофункциональной зрелости и фертилизационным потенциалом [42-45]. Более высокое количество копий мтДНК в сперматозоидах мужчин с нарушением фертильности может отражать дефекты в процессах сперматогенеза и спермиогенеза. Дефекты сперматогенеза, связанные с нарушением формирования жгутика и удалением большей части цитоплазмы в сперматиде, могут приводить к изменению количества и структуры митохондрий в сперматозоидах. Избыток цитоплазмы при таких морфологических аномалиях мужских гамет как «капля на шейке», капля на головке», вероятно, может характеризоваться повышенным количеством сперматозоидов с большим числом митохондрий и увеличенной копийностью мтДНК.

Предполагают, что увеличение копийности мтДНК может быть одним из компенсаторных механизмов клетки в ответ на патогенное воздействие различной этиологии, например, быть следствием компенсаторной реакции обратной связи, которая приводит к пролиферации в результате фрагментированной или нарушенной последовательности мтДНК [46]. Одним из факторов увеличения копийности мтДНК в мужских половых клетках является воздействие окислительного стресса, которому сперматозоиды подвержены в более высо-

кой степени, чем соматические клетки [47, 48]. Поэтому увеличение копий мтДНК в мужских гаметах может свидетельствовать о дисбалансе между образованием активных форм кислорода (свободные радикалы и пероксиды) и способностью клетки их инактивировать с помощью антиоксидантной системы (глутатион, супероксиддисмутаза, токоферол и т.д.). В поддержку этой гипотезы в исследовании Gabriel с соавт. сообщалось, что количество копий мтДНК в сперматозоидах выше у пациентов с варикоцеле по сравнению с контрольной группой, при этом после варикоцелэктомии количество копий мтДНК снижалось [49]. Полногеномный анализ показал, что копийность митохондриального генома в сперматозоидах связана с 218 дифференцированно метилированными регионами в генах *POLG*, *TWNK* и ряде других генов, что указывает на то, что метилирование ДНК может играть определенную роль в регуляции содержания мтДНК в половых клетках [50].

Показано, что на содержание мтДНК в мужских половых клетках оказывает влияние абберрантная экспрессия генов *TFAM* и *POLG*, которые являются регуляторами копийности молекул мтДНК [34] и могут приводить к её увеличению, наблюдаемому у мужчин с нарушением фертильности, патозооспермией.

Очевидно, содержание ДНК в мужских гаметах варьирует и зависит от большого количества факторов, влияющих на сперматогенез и спермиогенез, состояние как митохондриального, так и ядерного геномов в сперматогенных клетках.

Результативность программ экстракорпорального оплодотворения и копийность мтДНК в сперматозоидах

Качество половых клеток в значительной мере влияет на результативность программ экстракорпорального оплодотворения (ЭКО). В ряде исследований показано, что зрелые сперматозоиды с наибольшей способностью к оплодотворению отличаются низким содержанием мтДНК [36, 51]. Более высокая копийность мтДНК в мужских гаметах характеризуется более низкой вероятностью получения качественных эмбрионов в программах ЭКО [37, 52]. Так, в образцах эякулята пациентов с бесплодием или нарушением фертильности количество мтДНК сперматозоидов значительно увеличено. Wu с соавт. выявили снижение частоты оплодотворения у пациентов с большим количеством копий мтДНК, более низкое качество эмбрионов на 3-5 день развития, что приводило к более редкому переносу эмбрионов [37].

В связи с этим возникает вопрос о рисках, связанных с использованием вспомогательных репродуктивных технологий, таких как ИКСИ (инъекция сперматозоида в ооцит). Этот метод применяют при тяжелых формах мужского бесплодия, используя сперматозоиды, которые могут быть морфологически атипичными, а также незрелые сперматозоиды (сперматиды), полученные при биопсии яичка. Все эти клетки имеют более высокое содержание мтДНК, чем зрелые мужские гаметы [32]. Показано, что в раннем эмбриогенезе мтДНК инъектированных сперматозоидов элиминируется [53], но не во всех случаях. Так исследование St John с соавт. продемонстрировало, что при ЭКО/ИКСИ может происходить передача отцовской мтДНК [54]. Таким образом, в настоящее время нельзя исключить, что интрацитоплазматическая инъекция сперматозоидов с увеличенной копийностью мтДНК в ооциты может устранить механизм элиминации отцовской мтДНК, тем самым нарушая эмбриональное развитие и митохондриальное наследование. Однако частота передачи митохондрий и мтДНК сперматозоидов при оплодотворении естественным и искусственным путем недостаточно исследована.

Заключение

Исследования демонстрируют, что копийность мтДНК в половых клетках можно рассматривать как динамичный показатель, который отражает функциональное состояние митохондриального генома и как потенциальный биомаркер фертильности и качества гамет. Процессы, связанные с изменением количества, формы и структуры митохондрий, митохондриального генома в мужских половых клетках наряду с эпигенетическими модификациями ДНК являются важнейшими в сперматогенезе, однако детально механизмы взаимосвязи между копийностью мтДНК и параметрами эякулята не ясны. Неизвестно, является ли увеличение копийности мтДНК сперматозоидов причиной снижения параметров эякулята и нарушения мужской фертильности, или эти ассоциации обусловлены или опосредованы другими факторами. Дальнейшее изучение копийности мтДНК и состояния митохондриального генома в половых клетках, его корреляция с генетическими и эпигенетическими изменениями важны для совершенствования диагностики нарушений фертильности, генетического и репродуктологического консультирования, оценки качества гамет для ЭКО и разработки новых и совершенствования имеющихся методов ВРТ и профилактики наследственных заболеваний.

Литература/References

1. du Plessis S.S., Agarwal A., Mohanty G., van der Linde M. Oxidative phosphorylation versus glycolysis: what fuel do spermatozoa use? *Asian J Androl.* 2015;17(2):230-5. doi: 10.4103/1008-682X.135123.
2. Даниленко Н.Г., Давыденко О.Г. Миры геномов органелл. Минск: Технология, 2003. 494 с.
3. Yan C., Duanmu X., Zeng L., et al. Mitochondrial DNA: Distribution, Mutations, and Elimination. *Cells.* 2019;8(4):379. doi: 10.3390/cells8040379
4. Wai T., Ao A., Zhang X., et al. The role of mitochondrial DNA copy number in mammalian fertility. *Biol Reprod* 2010; 83:52–62.
5. Faja F., Carlini T., Coltrinari G., et al. Human sperm motility: a molecular study of mitochondrial DNA, mitochondrial transcription factor A gene and DNA fragmentation. *Mol Biol Rep.* 2019;46(4):4113-4121.
6. Chabi B., Mousson de Camaret B., Duborjal H., et al. Quantification of mitochondrial DNA deletion, depletion, and overreplication: application to diagnosis. *Clin Chem.* 2003;49(8):1309-17. doi: 10.1373/49.8.1309.
7. Kelly R.D., Mahmud A., McKenzie M., et al. Mitochondrial DNA copy number is regulated in a tissue specific manner by DNA methylation of the nuclear-encoded DNA polymerase gamma A. *Nucleic Acids Res.* 2012;40(20):10124-38. doi: 10.1093/nar/gks770.
8. Miller F.J., Rosenfeldt F.L., Zhang C., et al. Precise determination of mitochondrial DNA copy number in human skeletal and cardiac muscle by a PCR-based assay: lack of change of copy number with age. *Nucleic Acids Res.* 2003;31(11):e61. doi: 10.1093/nar/gng060.
9. Castellani C.A., Longchamps R.J., Sun J., et al. Thinking outside the nucleus: Mitochondrial DNA copy number in health and disease. *Mitochondrion.* 2020;53:214-223. doi: 10.1016/j.mito.2020.06.004.
10. Chen X., Prosser R., Simonetti S., et al. Rearranged mitochondrial genomes are present in human oocytes. *Am J Hum Genet.* 1995;57(2):239-47.
11. Ankel-Simons F., Cummins J.M. Misconceptions about mitochondria and mammalian fertilization: implications for theories on human evolution. *Proc Natl AcadSci U S A.* 1996;93(24):13859-63. doi: 10.1073/pnas.93.24.13859
12. Díez-Sánchez C., Ruiz-Pesini E., Lapeña A.C., et al. Mitochondrial DNA content of human spermatozoa. *Biol Reprod.* 2003;68(1):180-5. doi: 10.1095/biolreprod.102.005140
13. Yu M. Generation, function and diagnostic value of mitochondrial DNA copy number alterations in human cancers. *Life Sci.* 2011;89(3-4):65-71. doi: 10.1016/j.lfs.2011.05.010.
14. Clay Montier L.L., Deng J.J., Bai Y. Number matters: control of mammalian mitochondrial DNA copy number. *J Genet Genomics.* 2009;36(3):125-31. doi: 10.1016/S1673-8527(08)60099-5.
15. Malik A.N., Czajka A. Is mitochondrial DNA content a potential biomarker of mitochondrial dysfunction? *Mitochondrion.* 2013;13(5):481-92. doi: 10.1016/j.mito.2012.10.011.
16. Carra E., Sangiorgi D., Gattuccio F., Rinaldi A.M. Male infertility and mitochondrial DNA. *BiochemBiophys Res Commun.* 2004;322(1):333-9. doi: 10.1016/j.bbrc.2004.07.112
17. Bucci D., Spinaci M., Bustamante-Filho I.C., Nesci S. The sperm mitochondria: clues and challenges. *AnimReprod.* 2023;19(4):e20220131. doi: 10.1590/1984-3143-AR2022-0131.
18. Ruiz-Pesini E., Lapeña A.C., Díez-Sánchez C., et al. Human mtDNA haplogroups associated with high or reduced spermatozoa motility. *Am J Hum Genet.* 2000;67(3):682-96. doi: 10.1086/303040.
19. Holt I.J., Harding A.E., Morgan-Hughes J.A. Deletions of muscle mitochondrial DNA in patients with mitochondrial myopathies. *Nature.* 1988;331(6158):717-9. doi: 10.1038/331717a0.

20. Tengan C.H., Moraes C.T. Detection and analysis of mitochondrial DNA deletions by whole genome PCR. *Biochem Mol Med.* 1996; 58(1):130-4. doi: 10.1006/bmme.1996.0040.
21. Fromenty B., Manfredi G., Sadlock J., et al. Efficient and specific amplification of identified partial duplications of human mitochondrial DNA by long PCR. *Biochim Biophys Acta.* 1996;1308(3):222-30. doi: 10.1016/0167-4781(96)00110-8.
22. Ieremiadou F., Rodakis G.C. Correlation of the 4977 bp mitochondrial DNA deletion with human sperm dysfunction. *BMC Res Notes.* 2009;2:18. doi: 10.1186/1756-0500-2-18.
23. Kao S.H., Chao H.T., Wei Y.H. Mitochondrial deoxyribonucleic acid 4977 bp deletion is associated with diminished fertility and motility of human sperm. *BiolReprod.* 1995;52:729-36.
24. Cummins J.M., Jequier A.M., Martin R., et al. Semen levels of mitochondrial DNA deletions in men attending an infertility clinic do not correlate with phenotype. *Int J Androl* 1998, 21:47-52.
25. St John J.C., Jokhi R.P., Barratt C.L. Men with oligoasthenoteratozoospermia harbor higher numbers of multiple mitochondrial DNA deletions in their spermatozoa, but individual deletions are not indicative of overall aetiology. *Mol Hum Reprod* 2001, 7:103-111.
26. O'Connell M., McClure N., Lewis S.E. A comparison of mitochondrial and nuclear DNA status in testicular sperm from fertile men and those with obstructive azoospermia. *Hum Reprod* 2002, 17:1571-15717.
27. Reynier P., Chretien M.F., Savagner F., et al. Long PCR analysis of human gamete mtDNA suggests defective mitochondrial maintenance in spermatozoa and supports the bottleneck theory for oocytes. *Biochem Biophys Res Commun* 1998, 252:373-377.
28. Stefano G.B., Bjenning C., Wang F., et al. Mitochondrial Heteroplasmy. *Adv Exp Med Biol.* 2017;982:577-594. doi: 10.1007/978-3-319-55330-6_30.
29. Schon E.A. Mitochondrial genetics and disease. *Trends Biochem Sci.* 2000;25(11):555-60. doi: 10.1016/s0968-0004(00)01688-1
30. Cormier-Daire V., Bonnefont J.P., Rustin P., et al. Mitochondrial DNA rearrangements with onset as chronic diarrhea with villous atrophy. *J Pediatr.* 1994;124(1):63-70. doi: 10.1016/s0022-3476(94)70255-1.
31. Cavelier L., Johannisson A., Gyllensten U. Analysis of mtDNA copy number and composition of single mitochondrial particles using flow cytometry and PCR. *Exp Cell Res.* 2000;259(1):79-85. doi: 10.1006/excr.2000.4949.
32. May-Panloup P., Chrétien M.F., Savagner F., et al. Increased sperm mitochondrial DNA content in male infertility. *HumReprod.* 2003;18(3):550-6. doi: 10.1093/humrep/deg096.
33. Díez-Sánchez C., Ruiz-Pesini E., Lapeña A.C., et al. Mitochondrial DNA content of human spermatozoa. *Biol Reprod.* 2003;68(1):180-5. doi: 10.1095/biolreprod.102.005140
34. Amaral A., Ramalho-Santos J., St John J.C. The expression of polymerase gamma and mitochondrial transcription factor A and the regulation of mitochondrial DNA content in mature human sperm. *Hum Reprod.* 2007; 22(6):1585-96. doi: 10.1093/humrep/dem030.
35. Song G.J., Lewis V. Mitochondrial DNA integrity and copy number in sperm from infertile men. *Fertil Steril.* 2008;90(6):2238-44. doi: 10.1016/j.fertnstert.2007.10.059
36. Tian M., Bao H., Martin F.L., et al. Association of DNA methylation and mitochondrial DNA copy number with human semen quality. *Biol Reprod.* 2014; 91(4):101. doi: 10.1095/biolreprod.114.122465.
37. Wu H., Whitcomb B.W., Huffman A., et al. Associations of sperm mitochondrial DNA copy number and deletion rate with fertilization and embryo development in a clinical setting. *Hum Reprod.* 2019; 1;34(1):163-170. doi: 10.1093/humrep/dey330.
38. Timermans A., Otero F., Garrido M, et al. The relationship between sperm nuclear DNA fragmentation, mitochondrial DNA fragmentation, and copy number in normal and abnormal human ejaculates. *Andrology.* 2023 Oct 2. doi: 10.1111/andr.13539.
39. Zhang G., Wang Z., Ling X., et al. Mitochondrial biomarkers reflect semen quality: results from the MARCHS study in Chongqing, China. *PLoS One.* 2016;11(12):e0168823
40. St John J.C., Facucho-Oliveira J., Jiang Y., et al. Mitochondrial DNA transmission, replication and inheritance: a journey from the gamete through the embryo and into offspring and embryonic stem cells. *Hum Reprod Update.* 2010;16(5):488-509. doi: 10.1093/humupd/dmq002.
41. Hecht N.B., Liem H., Kleene K.C., et al. Maternal inheritance of the mouse mitochondrial genome is not mediated by a loss or gross alteration of the paternal mitochondrial DNA or by methylation of the oocyte mitochondrial DNA. *DevBiol.* 1984;102(2):452-61. doi: 10.1016/0012-1606(84)90210-0.
42. Solovova O.A., Chernykh V.B. Genetics of Oocyte Maturation Defects and Early Embryo Development Arrest. *Genes (Basel).* 2022;13(11):1920. doi: 10.3390/genes13111920.
43. Королькова А.И., Мишиева Н.Г., Мартазанова Б.А., Бурменская О.В., Веюкова М.А., Екимов А.Н., Трофимов Д.Ю., Абубакиров А.Н. Значимость копийности митохондриальной ДНК в клетках кумулюса пациенток позднего репродуктивного возраста. *Акушерство и гинекология.* 2019; 10: 108-114.
44. Сыркашева А.Г., Красный А.М., Майорова Т.Д., Макарова Н.П., Долгушина Н.В. Изучение числа копий митохондриальной ДНК в ооцитах человека с различными морфологическими аномалиями. *Молекулярная медицина.* 2016; 14(5): 37-41.
45. Лисицына О.И., Долгушина Н.В., Макарова Н.П., Бурменская О.В. Митохондриальная ДНК как маркер качества гамет и эмбрионов в программах вспомогательных репродуктивных технологий. *Акушерство и гинекология.* 2023; 7: 20-26.
46. Lee H.C., Yin P.H., Lu C.Y., et al. Increase of mitochondria and mitochondrial DNA in response to oxidative stress in human cells. *Biochem J.* 2000;348(Pt 2):425-32.
47. Abasalt H.C., Gholamali J.S., Maryam G.C. Lipid peroxidation and large-scale deletions of mitochondrial DNA in asthenoteratozoospermic patients. *Indian J Biochem Biophys.* 2013;50(6):492-9.
48. Bonanno O., Romeo G., Asero P., et al. Sperm of patients with severe asthenozoospermia show biochemical, molecular and genomic alterations. *Reproduction.* 2016;152(6):695-704. doi: 10.1530/REP-16-0342.
49. Gabriel M.S., Chan S.W., Alhathal N., et al. Influence of microsurgical varicolectomy on human sperm mitochondrial DNA copy number: a pilot study. *J Assist Reprod Genet.* 2012;29(8):759-64. doi: 10.1007/s10815-012-9785-z.
50. Oluwayiose O.A., Josyula S., Houle E., et al. Association between sperm mitochondrial DNA copy number and nuclear DNA methylation. *Epigenomics.* 2020;12(24):2141-2153. doi: 10.2217/epi-2020-0253.
51. Tiegs A.W., Tao X., Landis J., et al. Sperm Mitochondrial DNA Copy Number Is Not a Predictor of Intracytoplasmic Sperm Injection (ICSI) Cycle Outcomes. *Reprod Sci.* 2020;27(6):1350-1356. doi: 10.1007/s43032-020-00163-0.
52. Rosati A.J., Whitcomb B.W., Brandon N., et al. Sperm mitochondrial DNA biomarkers and couple fecundity. *Hum Reprod.* 2020;1;35(11):2619-2625. doi: 10.1093/humrep/deaa191.
53. Danan C., Sternberg D., Van Steirteghem A., et al. Evaluation of parental mitochondrial inheritance in neonates born after intracytoplasmic sperm injection. *Am J Hum Genet.* 1999; 65(2):463-73. doi: 10.1086/302484.
54. St John J., Sakkas D., Dimitriadi K., et al. Failure of elimination of paternal mitochondrial DNA in abnormal embryos. *Lancet.* 2000;15;355(9199):200. doi: 10.1016/s0140-6736(99)03842-8.