

СРАВНИТЕЛЬНЫЙ АНАЛИЗ БИОХИМИЧЕСКИХ МАРКЕРОВ КЛЕТОЧНЫХ ОРГАНЕЛЛ СПЕРМАТОЗОИДА ЧЕЛОВЕКА ПРИ ПОМОЩИ КОНФОКАЛЬНОЙ РАМАНОВСКОЙ СПЕКТРОСКОПИИ

Р. В. Назаренко¹ ✉, А. В. Иржак², Б. Р. Гвасалия³, Д. Ю. Пушкар³

¹ ООО «Клиника профессора Здановского», Москва, Россия

² Институт проблем технологии микроэлектроники и особо чистых материалов, Российской академии наук, Черноголовка, Россия

³ Российский университет медицины, Москва, Россия

Несмотря на широкое распространение методов исследования структуры и функциональной активности сперматозоидов, их практическое применение в программах экстракорпорального оплодотворения на современном этапе достаточно ограничено. Прежде всего, ограничение связано с деструктивным характером методов. Целью работы было исследование возможности конфокальной рамановской спектроскопии в анализе биохимических маркеров клеточных органелл сперматозоида человека. Анализ 176 спектров сперматозоидов, полученных от здоровых доноров спермы в возрасте 18–35 лет, выполняли на конфокальном рамановском микроскопе Senterra фирмы Bruker (Германия). Спектры снимали с акросомы, ядра и шейки сперматозоида. Дополнительно суспензию сперматозоидов подвергали воздействию фокусированного пучка рентгеновского излучения. В результате были выделены пики, присущие ДНК ядра сперматозоида — 1092 см⁻¹ и 780 см⁻¹, характерные для шейки — 748 см⁻¹ (маркер митохондриальной ДНК), для спектров с акросомы характерно изменение формы тройного пика 1420 см⁻¹, 1445 см⁻¹ и 1486 см⁻¹ с преобладанием средней части в области 1445 см⁻¹. Различий в основных рамановских пиках, присущих клеткам после повреждения ДНК при воздействии рентгеновского излучения в течение 5 и 10 мин, по сравнению с интактными образцами отмечено не было. Конфокальная рамановская спектроскопия является перспективным неинвазивным методом исследования ультраструктуры и биохимических процессов сперматозоида.

Ключевые слова: конфокальная рамановская спектроскопия, сперматозоид, фрагментация ДНК, биохимический профиль, метаболомика

Вклад авторов: Р. В. Назаренко — сбор и анализ данных, написание текста статьи; А. В. Иржак — сбор и анализ данных; Б. Р. Гвасалия, Д. Ю. Пушкар — редактирование статьи.

Соблюдение этических стандартов: исследование одобрено этическим комитетом ФГБУ «НМИЦ АГП им. В. И. Кулакова» (протокол № 10 от 28 октября 2021 г.).

✉ **Для корреспонденции:** Руслан Вадимович Назаренко
nazrusvad@gmail.com

Статья получена: 22.02.2025 **Статья принята к печати:** 17.03.2025 **Опубликована онлайн:** 31.03.2025

DOI: 10.24075/vrgmu.2025.016

Авторские права: © 2025 принадлежат авторам. **Лицензиат:** РНИМУ им. Н. И. Пирогова. Статья размещена в открытом доступе и распространяется на условиях лицензии Creative Commons Attribution (CC BY) (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

COMPARATIVE ANALYSIS OF THE HUMAN SPERM CELL ORGANELLE BIOCHEMICAL MARKERS BY CONFOCAL RAMAN SPECTROSCOPY

Nazarenko RV¹ ✉, Irzhak AV², Gvasalia BR³, Pushkar DYU³

¹ Professor Zdanovsky Clinic LLC, Moscow, Russia

² Institute of Microelectronics Technology and High Purity Materials of the Russian Academy of Sciences, Chernogolovka, Russia

³ Russian University of Medicine, Moscow, Russia

Despite widespread use of methods to assess structure and functional activity of spermatozoa, practical application of those in *in vitro* fertilization programs is currently rather limited. Limitations are primarily due to destructive nature of the methods. The study aimed to investigate the capabilities of confocal Raman spectroscopy in analysis of the human sperm organelle biochemical markers. Assessment of 176 spectra of spermatozoa collected from healthy sperm donors aged 18–35 years was performed using the Bruker Senterra confocal Raman microscope (Germany). Spectra were acquired from the sperm acrosome, nucleus, and midpiece. In addition, the spermatozoa suspension was exposed to a focused x-ray beam. As a result, bands were identified inherent to the sperm nuclear DNA — 1092 cm⁻¹ and 780 cm⁻¹, typical for the head — 748 cm⁻¹ (mitochondrial DNA marker); changes of shape of the triple band 1420 cm⁻¹, 1445 cm⁻¹ and 1486 cm⁻¹ with predominance of the middle part 1445 cm⁻¹ are typical for acrosomal spectra. No differences in the main Raman bands inherent to cells post DNA damage under exposure to x-ray radiation for 5 and 10 min relative to intact samples were reported. Confocal Raman spectroscopy is a promising noninvasive method to assess sperm ultrastructure and biochemical processes.

Keywords: confocal Raman spectroscopy, sperm, DNA fragmentation, biochemical profile, metabolomics

Author contribution: Nazarenko RV — data acquisition and analysis, manuscript writing; Irzhak AV — data acquisition and analysis; Gvasalia BR, Pushkar DYU — manuscript editing.

Compliance with ethical standards: the study was approved by the Ethics Committee of the Kulakov National Medical Research Center for Obstetrics, Gynecology and Perinatology (protocol No. 10 dated 28 October 2021).

✉ **Correspondence should be addressed:** Ruslan V. Nazarenko
nazrusvad@gmail.com

Received: 22.02.2025 **Accepted:** 17.03.2025 **Published online:** 31.03.2025

DOI: 10.24075/brsmu.2025.016

Copyright: © 2025 by the authors. **Licensee:** Pirogov University. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

Последние десятилетия ознаменовались значительными достижениями в самых различных областях, связанных с наукоемкими технологиями. Не исключением стала и репродуктивная медицина. С каждым годом появляется все больше методов исследования биологических материалов, привлекающих внимание ученых.

Одним из новых методов является рамановская спектроскопия (или спектроскопия комбинационного рассеяния), принципы которой описаны уже более 80 лет назад. Несмотря на давнюю историю, только совершенствование аппаратуры и программного обеспечения позволило применить эту методику для исследования детальной молекулярной структуры («отпечатка») биологического образца.

Неуклонно растет интерес исследователей к проблеме мужского бесплодия вообще и, в частности, к идентификации поломок ядерной ДНК сперматозоида. Известно, что сперматозоид может обладать хорошей морфологией и подвижностью согласно критериям оценки Всемирной организации здравоохранения, однако эмбрион, образовавшийся при оплодотворении яйцеклетки таким сперматозоидом, отличается плохим качеством, низким уровнем имплантации и часто останавливается в развитии [1–2]. Часть поломок ДНК в сперматозоиде может восстановить яйцеклетка, но при накоплении критической массы повреждений, репаративной системы ооцита оказывается недостаточно. В связи с этим возрастает интерес к исследованию ядерной ДНК сперматозоида и оценки ее функционального состояния. Так как рутинные методы исследования эякулята при помощи световой микроскопии не позволяют получить такую информацию, в последнее время стали широко распространяться дополнительные методы оценки сперматозоида. В частности это касается методов исследования фрагментации ДНК сперматозоидов [3–7]. К ним можно отнести: окраску анилиновым голубым, хромомином АЗ, метод дисперсии хроматина (Comet), TUNEL, SCSA и др. К сожалению, все эти методы деструктивны, а, следовательно, несут крайне мало практически полезной информации для использования во вспомогательных репродуктивных технологиях. Существует потребность в методе, который соответствовал бы следующим критериям: позволял исследовать единственный сперматозоид без его повреждения, позволял проводить оценку целостности ядерной ДНК сперматозоида и его функционального состояния, т. е. биохимического и метаболического профиля, и использования данного сперматозоида для последующего оплодотворения методом ИКСИ (интрацитоплазматическое введение сперматозоида в яйцеклетку). С учетом вышеизложенных требований весьма перспективным представляется изучение возможностей конфокальной рамановской спектроскопии для получения более глубокой информации о строении и функциональном состоянии сперматозоида.

В последнее время появляется все больше работ, посвященных применению конфокальной рамановской спектроскопии для исследования биологических тканей, живых клеток, субклеточных органелл и метаболических внутриклеточных процессов. Однако существует не так много работ по изучению спектральных характеристик сперматозоида. В 1980 г. была применена рамановская спектроскопия на живой клетке с использованием сперматозоида лосося [8]. При сравнении рамановских спектров, полученные от сперматозоидов с нормальной и аномальной морфологией [9], исследователи пришли

к выводу, что не всегда морфология сперматозоида коррелирует с правильной упаковкой ее ядерной ДНК. При изучении спектров, полученных от субклеточных органелл, а также влияния на них УФ-излучения [10] описаны спектры от акросомы, ядра и шейки сперматозоида. Работу по применению рамановской спектроскопии в визуализации повреждений ядерной ДНК сперматозоида продолжили и другие авторы [11]. Для нарушения структуры ДНК они использовали УФ-облучение и зафиксировали характерное изменение пиков в области 1095/1050 см^{-1} . Было также описано оксидативное повреждение ДНК в реакции Fenton с перекисью водорода [12]. Спектры, полученные с поврежденных таким образом сперматозоидов, полностью соответствовали представленным ранее [11]. Нами было высказано предположение о связи морфологии сперматозоида, целостности его ядерной ДНК и рамановских спектров, полученных с области ядра [13]. Впоследствии эти результаты были подтверждены другими авторами с использованием красителей хромомицина АЗ, анилинового голубого и акридинового оранжевого для комплексной оценки нуклеопротеинового комплекса сперматозоида [14].

В эпоху революции omics (метабомика, протеомика и т. д.) рамановская спектроскопия является мощным инструментом для исследования биохимических процессов в клетке. Однако использование этого метода и интерпретация результатов невозможны без привлечения специалистов — физиков, химиков, математиков, так как знания и навыки, необходимые при работе с данной методикой, выходят далеко за пределы биологического или медицинского образования.

Цель исследования — получить информацию о спектральных характеристиках клеточных органелл сперматозоида человека. Оценить влияние повреждающего действия рентгеновского излучения на нуклеопротеиновый комплекс ядра сперматозоида человека по изменению рамановского спектра.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Здоровые доноры сдавали образцы спермы с помощью мастурбации. Период полового воздержания составлял 2–7 дней.

Критерии включения доноров спермы в исследование: возраст 18–35 лет; отсутствие гемотрансмиссивных инфекций; отсутствие инфекций, передающихся половым путем; отсутствие тяжелых хронических соматических заболеваний; отсутствие психических заболеваний; нормальный мужской кариотип 46 XY.

Критерии исключения доноров спермы из исследования: повышенная температура тела на момент сдачи эякулята; прием антибиотиков, глюкокортикоидов, антидепрессантов на момент сдачи эякулята; отсутствие требуемого (2–7 дней) периода полового воздержания.

В каждом случае выполняли рутинное семиологическое исследование эякулята при помощи световой микроскопии. Результаты интерпретировали согласно Рекомендациям ВОЗ 2010 г., результаты соответствовали нормозооспермии.

Процедура пробоподготовки перед конфокальной рамановской спектроскопией

Эякулят центрифугировали в двойном градиенте плотности (FertiPro, Breenem; Бельгия) в течение 20 минут при 415 g.

После удаления супернатанта осадок ресуспендировали с PBS (phosphate buffered saline; Sigma–Aldrich, США) при 37 °C и повторно центрифугировали в течение 10 мин при 415 g. Далее 10 мкл суспензии сперматозоидов наносили на алюминиевую подложку, препарат фиксировали 70%-м спиртом и высушивали на воздухе.

Конфокальная рамановская спектроскопия

Исследования выполняли на конфокальном рамановском микроскопе Senterra (Bruker, Германия). Прибор состоит из двух основных блоков — конфокального бинокулярного микроскопа с возможностью оцифровки изображения и спектрометра. Полностью конфокальная система способна приспособляться к трем различным возбуждающим длинам волн, при этом обеспечивая максимально возможное пространственное разрешение. Так как Senterra базируется на оптическом микроскопе, доступны все необходимые инструменты для визуальной характеристики образца. Спектральный анализ различных компартментов (ядра, акросомы, шейки) сперматозоида проводили при длине волны возбуждающего лазера 532 нм и мощности 10 мВт в диапазоне 280–1730 см^{-1} с разрешением 3–5 см^{-1} . Время накопления сигнала в точке составило 3 раза по 20 с. Безопасность воздействия лазерного излучения на клетку и отсутствие фотоиндуцированного повреждения при указанных параметрах мощности подтверждены в литературе [15].

Предварительная обработка спектров

Каждый спектр анализировали в диапазоне 680–1700 см^{-1} после коррекции базовой линии полиномиальной функцией 4-й степени (Polynomial baseline fitting) и сглаживания по методу скользящего среднего по 21 точке. Кроме того была выполнена стандартизация нормировкой вариации (SNV, standard normal variate) всех спектров.

На основе преобработанных спектров составили матрицу данных X (176 × 510), где в каждой строке записаны интенсивности рамановских спектров в интервале 680–1700 см^{-1} с шагом 2 см^{-1} , а количество строк соответствует количеству спектров.

Вторым этапом оценивали последствия повреждающего воздействия рентгеновского излучения на сперматозоид. Для этого суспензию сперматозоидов разделяли на три аликвоты. Первую аликвоту составлял контрольный образец; вторую и третью аликвоты подвергали воздействию фокусированного пучка рентгеновского излучения в течение 5 и 10 мин соответственно. Полученные результаты сравнивали между собой.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Было исследовано 19 образцов спермы, взятой у 19 здоровых доноров в возрасте от 18 до 35 лет. Всего было снято 176 спектров; определены спектры, присущие сперматозоиду с нормальной морфологией.

На рис. 1А представлен морфологически нормальный сперматозоид. Точками обозначены участки, с которых производилось снятие спектров. Метка номер 1 соответствует ядру сперматозоида, номер 2 — акросоме, номер 3 — средней части. На рис. 1Б представлен сравнительный график спектральных характеристик, полученных с каждого участка.

Рамановские спектры, полученные от ядра интактных сперматозоидов и сперматозоидов, подвергшихся воздействию рентгеновского излучения в течение 5 и 10 мин, представлены на рис. 2.

Несмотря на разную интенсивность в полученных спектрах, мы не отметили различий в основных рамановских пиках, присущих клеткам при повреждении ДНК при воздействии рентгеновского излучения в течение 5 и 10 мин по сравнению с интактными образцами.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Как причины, приводящие к неправильному развитию сперматозоида или его последующему повреждению, крайне разнообразны, так и проявления подобных нарушений имеют мультивалентную природу.

Опираясь на данные литературы, мы сопоставили полученные нами пики, регистрируемые при рамановской спектроскопии с соответствующими им группами атомов (см. таблицу).

При анализе спектров сперматозоида (рис. 1Б) можно выделить следующие характерные пики.

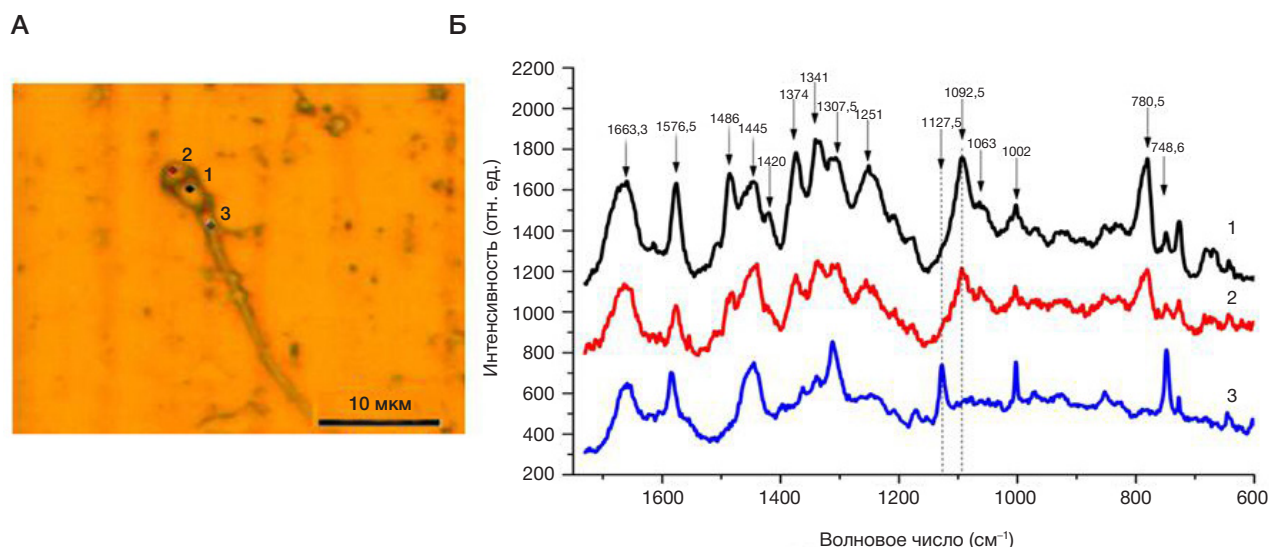


Рис. 1. А. Микрофотография морфологически нормального сперматозоида. 1 (черная точка) — фокусировка луча на области ядра; 2 (красная точка) — фокусировка луча на акросоме; 3 (голубая точка) — фокусировка луча на шейке сперматозоида. Б. Спектральные характеристики, полученные с области ядра (черная линия — 1), с акросомы (красная линия — 2), с шейки сперматозоида (голубая линия — 3)

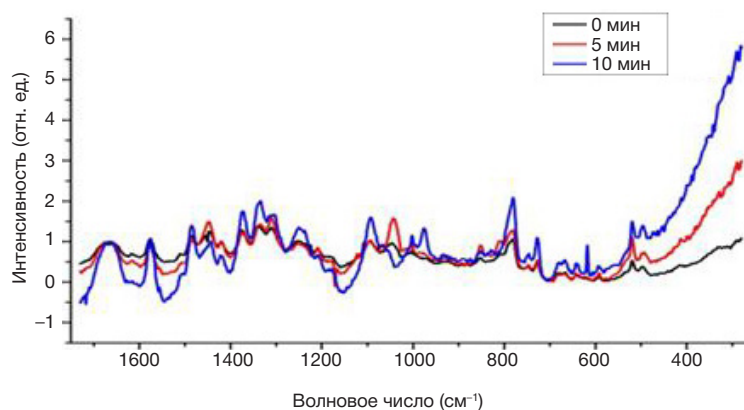


Рис. 2. Спектральные характеристики, полученные с морфологически нормального интактного сперматозоида (черная линия), при воздействии рентгеновского излучения в течение 5 мин (красная линия), в течение 10 мин (синяя линия)

Присущие ДНК ядра (1092 см^{-1} и 780 см^{-1}). Пик 1092 см^{-1} является маркером В-ДНК и Z-ДНК. В норме для него характерно пологое или горизонтальное плечо в области 1063 см^{-1} . Данная особенность присуща ядру с неповрежденной ДНК. Пик в области 780 см^{-1} соответствует вибрациям тимина и цитозина, а также остову ДНК. По мнению некоторых авторов, данный пик служит маркером протаминовой упаковки ДНК, что было подтверждено более поздними исследованиями [9, 16]. Тройной пик в областях 1420 см^{-1} , 1445 см^{-1} и 1486 см^{-1} отличается определенной формой в виде «лестницы» с наиболее высокой частью в области 1486 см^{-1} . Пик, характерный для аминокислоты фенилаланин (1002 см^{-1}), является постоянным и присутствует практически на всех графиках с разной интенсивностью.

Присущие акросоме. Анализируя спектральные характеристики акросомы, можно отметить общее снижение интенсивности практически всех пиков. Характерно изменение формы тройного пика 1420 см^{-1} , 1445 см^{-1} и 1486 см^{-1} с преобладанием средней части в области 1445 см^{-1} , что соответствует метиленовой деформации эндогенных липидов.

Присущие средней части сперматозоида (шейке). Спектральные характеристики средней части отличаются пиком высокой интенсивности в области 748 см^{-1} — маркером присутствия митохондрий [4]. Также растет интенсивность пика 1576 см^{-1} , который помимо нуклеиновых кислот соответствует большому количеству

АТФ [10]. Обращают на себя внимание исчезновение пика 1092 см^{-1} и перемещение его в область 1127 см^{-1} . Возможно это связано с присутствием митохондриальной ДНК, но подтверждения этому в источниках литературы мы не нашли.

Отсутствие значимых изменений в спектрах при воздействии рентгеновского излучения может быть объяснено достаточно высокой стабильностью интактного нуклеопротеинового комплекса зрелого сперматозоида в отличие от активно делящихся клеток-предшественниц сперматогенного ряда.

ВЫВОДЫ

Проведенное пилотное исследование позволило показать возможности рамановской спектроскопии в исследовании биохимических процессов и ультраструктуры сперматозоида. Были созданы собственная библиотека спектров, полученных с нормальных сперматозоидов, и модель с искусственным повреждением сперматозоидов пучком рентгеновского излучения. Исследование проведено на фиксированном сперматозоиде, тем не менее, при помощи конфокальной рамановской спектроскопии с использованием оптического (лазерного) пинцета теоретически возможно отбирать неповрежденный живой сперматозоид и использовать его для оплодотворения с помощью ИКСИ. Нужны дальнейшие работы в этом направлении.

Таблица. Основные рамановские пики и соответствующие им группы атомов [9, 17–21]

Волновое число, см^{-1}	Нуклеиновая кислота	Аминокислоты	Липиды
748	U, C		
782	T, C, остов ДНК		
1002		Фенилаланин	
1045	Маркер повреждения ДНК		
1092	PO_2^- маркер В-ДНК и Z-ДНК		
1251	A, C	N-H и C-H Амид III	PO_2^- Фосфолипиды
1307	A	N-H и C-H Амид III	
1341	G	N-H и C-H Амид III	
1374	A, T, C		
1420	A		
1445			Метиленовая деформация (эндогенные липиды)
1486	G, A		
1576	G, A		
1663	T	C=O Амид I	C=C ненасыщенные липидные связи

Литература

- Speyer BE, Pizzey AR, Ranieri M, Joshi R, Delhanty JDA, Serhal P. Fall in implantation rates following ICSI with sperm with high DNA fragmentation. *Human Reproduction*. Oxford University Press (OUP). 2010; 25 (7): 1609–18. Available from: <http://dx.doi.org/10.1093/humrep/deq116>.
- Fu W, Cui Q, Yang Z, Bu Z, Shi H, Bi B, et al. High sperm DNA fragmentation increased embryo aneuploidy rate in patients undergoing preimplantation genetic testing. *Reproductive BioMedicine Online*. 2023; 47 (6): 103366. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.rbmo.2023.103366>.
- Evenson DP, Larson KL, Jost LK. Sperm Chromatin Structure Assay: Its Clinical Use for Detecting Sperm DNA Fragmentation in Male Infertility and Comparisons With Other Techniques. *Journal of Andrology*. Wiley-Blackwell. 2002; 23 (1): 25–43. Available from: <http://dx.doi.org/10.1002/j.1939-4640.2002.tb02599.x>.
- Tesarik J, Mendoza-Tesarik R, Mendoza C. Sperm nuclear DNA damage: update on the mechanism, diagnosis and treatment. *Reproductive BioMedicine Online*. Elsevier BV. 2006; 12 (6): 715–21. Available from: [http://dx.doi.org/10.1016/s1472-6483\(10\)61083-8](http://dx.doi.org/10.1016/s1472-6483(10)61083-8).
- Chi H-J, Chung D-Y, Choi S-Y, Kim J-H, Kim G-Y, Lee J-S, et al. Integrity of human sperm DNA assessed by the neutral comet assay and its relationship to semen parameters and clinical outcomes for the IVF-ET program. *Clinical and Experimental Reproductive Medicine*. The Korean Society for Reproductive Medicine (KAMJE); 2011; 38 (1): 10. Available from: <http://dx.doi.org/10.5653/cerm.2011.38.1.10>.
- Sharma R, Iovine C, Agarwal A, Henkel R. TUNEL assay — Standardized method for testing sperm DNA fragmentation. *Andrologia*. 2020; 53 (2). Available from: <http://dx.doi.org/10.1111/and.13738>.
- Andrabi SW, Ara A, Saharan A, Jaffar M, Gugnani N, Esteves SC. Sperm DNA fragmentation test: usefulness in assessing male fertility and assisted reproductive technology outcomes. *Panminerva Medica*. 2023; 65 (2). Available from: <http://dx.doi.org/10.23736/s0031-0808.23.04836-x>.
- Kubasek WL, Wang Y, Thomas GA, Patapoff TW, Schoenwaelder KH, Van der Sande JH, et al. Raman spectra of the model B-DNA oligomer d(CGCGAATTCGCG)2 and of the DNA in living salmon sperm show that both have very similar B-type conformations. *Biochemistry*. American Chemical Society (ACS). 1986; 25 (23): 7440–5. Available from: <http://dx.doi.org/10.1021/bi00371a028>.
- Huser T, Orme CA, Hollars CW, Corzett MH, Balhorn R. Raman spectroscopy of DNA packaging in individual human sperm cells distinguishes normal from abnormal cells. *Journal of Biophotonics*. Wiley-Blackwell. 2009; 2 (5): 322–32. Available from: <http://dx.doi.org/10.1002/jbio.200910012>.
- Meister K, Schmidt DA, Bründemann E, Havenith M. Confocal Raman microspectroscopy as an analytical tool to assess the mitochondrial status in human spermatozoa. *The Analyst*. Royal Society of Chemistry (RSC). 2010; 135 (6): 1370. Available from: <http://dx.doi.org/10.1039/b927012d>.
- Mallidis C, Wistuba J, Bleisteiner B, Damm OS, Gross P, Wubbeling F, et al. In situ visualization of damaged DNA in human sperm by Raman microspectroscopy. *Human Reproduction*. Oxford University Press (OUP). 2011; 26 (7): 1641–9. Available from: <http://dx.doi.org/10.1093/humrep/der122>.
- Sánchez V, Redmann K, Wistuba J, Wubbeling F, Burger M, Oldenhof H, et al. Oxidative DNA damage in human sperm can be detected by Raman microspectroscopy. *Fertility and Sterility*. Elsevier BV. 2012; 98 (5): 1124–9.e3. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.fertnstert.2012.07.1059>.
- Nazarenko RV, Irzhak AV, Pomerantsev AL, Rodionova OYe. Confocal Raman spectroscopy and multivariate data analysis for evaluation of spermatozoa with normal and abnormal morphology. A feasibility study. *Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems*. 2018; 182: 172–9. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.chemolab.2018.10.002>.
- Jahmani MY, Hammadeh ME, Al Smadi MA, Baller MK. Label-Free Evaluation of Chromatin Condensation in Human Normal Morphology Sperm Using Raman Spectroscopy. *Reproductive Sciences*. 2021; 28 (9): 2527–39. Available from: <http://dx.doi.org/10.1007/s43032-021-00494-6>.
- Edenberger E, Meister K, Bründemann E, Büning S, Ebbinghaus S, Havenith M. Non-invasive chemical assessment of living human spermatozoa. *RSC Adv*. 2015; 5: 10424–9. Available from: <https://doi.org/10.1039/c4ra12158a>.
- Li M, Ji Y, Wang D, Zhang Y, Zhang H, Tang Y, et al. Evaluation of Laser Confocal Raman Spectroscopy as a Non-Invasive Method for Detecting Sperm DNA Contents. *Frontiers in Physiology*. 2022; 13. Available from: <http://dx.doi.org/10.3389/fphys.2022.827941>.
- Li X, Wang M, Chen H, Li Q, Yang H, Xu H, et al. Flow cytometric and near-infrared Raman spectroscopic investigation of quality in stained, sorted, and frozen-thawed buffalo sperm. *Animal Reproduction Science*. Elsevier BV. 2016; 170: 90–9. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.anireprosci.2016.04.008>.
- Ellis DI, Cowcher DP, Ashton L, O'Hagan S, Goodacre R. Illuminating disease and enlightening biomedicine: Raman spectroscopy as a diagnostic tool. *The Analyst*. Royal Society of Chemistry (RSC). 2013; 138 (14): 3871. Available from: <http://dx.doi.org/10.1039/c3an00698k>.
- Ferrara M, Di Caprio G, Managò S, De Angelis A, Sirteto L, Coppola G, et al. Label-Free Imaging and Biochemical Characterization of Bovine Sperm Cells. *Biosensors*. MDPI AG. 2015; 5 (2): 141–57. Available from: <http://dx.doi.org/10.3390/bios5020141>.
- Li N, Chen D, Xu Y, Liu S, Zhang H. Confocal Raman microspectroscopy for rapid and label-free detection of maleic acid-induced variations in human sperm. *Biomedical Optics Express*. The Optical Society. 2014; 5 (5): 1690. Available from: <http://dx.doi.org/10.1364/boe.5.001690>.
- Rimskaya E, Gorevoy A, Shelygina S, Perevedentseva E, Timurzieva A, Saraeva I, et al. Multi-Wavelength Raman Differentiation of Malignant Skin Neoplasms. *International Journal of Molecular Sciences*. 2024; 25 (13): 7422. Available from: <http://dx.doi.org/10.3390/ijms25137422>.

References

- Speyer BE, Pizzey AR, Ranieri M, Joshi R, Delhanty JDA, Serhal P. Fall in implantation rates following ICSI with sperm with high DNA fragmentation. *Human Reproduction*. Oxford University Press (OUP). 2010; 25 (7): 1609–18. Available from: <http://dx.doi.org/10.1093/humrep/deq116>.
- Fu W, Cui Q, Yang Z, Bu Z, Shi H, Bi B, et al. High sperm DNA fragmentation increased embryo aneuploidy rate in patients undergoing preimplantation genetic testing. *Reproductive BioMedicine Online*. 2023; 47 (6): 103366. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.rbmo.2023.103366>.
- Evenson DP, Larson KL, Jost LK. Sperm Chromatin Structure Assay: Its Clinical Use for Detecting Sperm DNA Fragmentation in Male Infertility and Comparisons With Other Techniques. *Journal of Andrology*. Wiley-Blackwell. 2002; 23 (1): 25–43. Available from: <http://dx.doi.org/10.1002/j.1939-4640.2002.tb02599.x>.
- Tesarik J, Mendoza-Tesarik R, Mendoza C. Sperm nuclear DNA damage: update on the mechanism, diagnosis and treatment. *Reproductive BioMedicine Online*. Elsevier BV. 2006; 12 (6): 715–21. Available from: [http://dx.doi.org/10.1016/s1472-6483\(10\)61083-8](http://dx.doi.org/10.1016/s1472-6483(10)61083-8).
- Chi H-J, Chung D-Y, Choi S-Y, Kim J-H, Kim G-Y, Lee J-S, et al. Integrity of human sperm DNA assessed by the neutral comet assay and its relationship to semen parameters and clinical outcomes for the IVF-ET program. *Clinical and Experimental Reproductive Medicine*. The Korean Society for Reproductive Medicine (KAMJE); 2011; 38 (1): 10. Available from: <http://dx.doi.org/10.5653/cerm.2011.38.1.10>.
- Sharma R, Iovine C, Agarwal A, Henkel R. TUNEL assay — Standardized method for testing sperm DNA fragmentation. *Andrologia*. 2020; 53 (2). Available from: <http://dx.doi.org/10.1111/and.13738>.
- Andrabi SW, Ara A, Saharan A, Jaffar M, Gugnani N, Esteves SC. Sperm DNA fragmentation test: usefulness in assessing

- male fertility and assisted reproductive technology outcomes. *Panminerva Medica*. 2023; 65 (2). Available from: <http://dx.doi.org/10.23736/s0031-0808.23.04836-x>.
8. Kubasek WL, Wang Y, Thomas GA, Patapoff TW, Schoenwaelder KH, Van der Sande JH, et al. Raman spectra of the model B-DNA oligomer d(CGCGAATTCGCG)2 and of the DNA in living salmon sperm show that both have very similar B-type conformations. *Biochemistry*. American Chemical Society (ACS). 1986; 25 (23): 7440–5. Available from: <http://dx.doi.org/10.1021/bi00371a028>.
 9. Huser T, Orme CA, Hollars CW, Corzett MH, Balhorn R. Raman spectroscopy of DNA packaging in individual human sperm cells distinguishes normal from abnormal cells. *Journal of Biophotonics*. Wiley-Blackwell. 2009; 2 (5): 322–32. Available from: <http://dx.doi.org/10.1002/jbio.200910012>.
 10. Meister K, Schmidt DA, Bründermann E, Havenith M. Confocal Raman microspectroscopy as an analytical tool to assess the mitochondrial status in human spermatozoa. *The Analyst*. Royal Society of Chemistry (RSC). 2010; 135 (6): 1370. Available from: <http://dx.doi.org/10.1039/b927012d>.
 11. Mallidis C, Wistuba J, Bleisteiner B, Damm OS, Gross P, Wübbeling F, et al. In situ visualization of damaged DNA in human sperm by Raman microspectroscopy. *Human Reproduction*. Oxford University Press (OUP). 2011; 26 (7): 1641–9. Available from: <http://dx.doi.org/10.1093/humrep/der122>.
 12. Sánchez V, Redmann K, Wistuba J, Wübbeling F, Burger M, Oldenhof H, et al. Oxidative DNA damage in human sperm can be detected by Raman microspectroscopy. *Fertility and Sterility*. Elsevier BV. 2012; 98 (5): 1124–9.e3. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.fertnstert.2012.07.1059>.
 13. Nazarenko RV, Irzhak AV, Pomerantsev AL, Rodionova OYe. Confocal Raman spectroscopy and multivariate data analysis for evaluation of spermatozoa with normal and abnormal morphology. A feasibility study. *Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems*. 2018; 182: 172–9. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.chemolab.2018.10.002>.
 14. Jahmani MY, Hammadeh ME, Al Smadi MA, Baller MK. Label-Free Evaluation of Chromatin Condensation in Human Normal Morphology Sperm Using Raman Spectroscopy. *Reproductive Sciences*. 2021; 28 (9): 2527–39. Available from: <http://dx.doi.org/10.1007/s43032-021-00494-6>.
 15. Edengeiser E, Meister K, Bründermann E, Büning S, Ebbinghaus S, Havenith M. Non-invasive chemical assessment of living human spermatozoa. *RSC Adv*. 2015; 5: 10424–9. Available from: <https://doi.org/10.1039/c4ra12158a>.
 16. Li M, Ji Y, Wang D, Zhang Y, Zhang H, Tang Y, et al. Evaluation of Laser Confocal Raman Spectroscopy as a Non-Invasive Method for Detecting Sperm DNA Contents. *Frontiers in Physiology*. 2022; 13. Available from: <http://dx.doi.org/10.3389/fphys.2022.827941>.
 17. Li X, Wang M, Chen H, Li Q, Yang H, Xu H, et al. Flow cytometric and near-infrared Raman spectroscopic investigation of quality in stained, sorted, and frozen-thawed buffalo sperm. *Animal Reproduction Science*. Elsevier BV. 2016; 170: 90–9. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.anireprosci.2016.04.008>.
 18. Ellis DI, Cowcher DP, Ashton L, O'Hagan S, Goodacre R. Illuminating disease and enlightening biomedicine: Raman spectroscopy as a diagnostic tool. *The Analyst*. Royal Society of Chemistry (RSC). 2013; 138 (14): 3871. Available from: <http://dx.doi.org/10.1039/c3an00698k>.
 19. Ferrara M, Di Caprio G, Managò S, De Angelis A, Sirlito L, Coppola G, et al. Label-Free Imaging and Biochemical Characterization of Bovine Sperm Cells. *Biosensors*. MDPI AG. 2015; 5 (2): 141–57. Available from: <http://dx.doi.org/10.3390/bios5020141>.
 20. Li N, Chen D, Xu Y, Liu S, Zhang H. Confocal Raman microspectroscopy for rapid and label-free detection of maleic acid-induced variations in human sperm. *Biomedical Optics Express*. The Optical Society. 2014; 5 (5): 1690. Available from: <http://dx.doi.org/10.1364/boe.5.001690>.
 21. Rimskaya E, Gorevoy A, Shelygina S, Perevedentseva E, Timurzieva A, Saraeva I, et al. Multi-Wavelength Raman Differentiation of Malignant Skin Neoplasms. *International Journal of Molecular Sciences*. 2024; 25 (13): 7422. Available from: <http://dx.doi.org/10.3390/ijms25137422>.