

**Česká zemědělská univerzita v Praze**

**Fakulta agrobiologie, potravinových a přírodních zdrojů**

**Katedra veterinárních disciplín**



**Integrita DNA spermií býků ve vztahu k jejich  
kryokonzervaci**

**Diplomová práce**

**Autor práce: Bc. Hana Pavlíčková**

**Obor studia: Reprodukční biotechnologie**

**Vedoucí práce: Ing. Ondřej Šimoník**

© 2018 ČZU v Praze

### **Čestné prohlášení**

Prohlašuji, že svou diplomovou práci "Integrita DNA spermií býku ve vztahu k jejich kryokonzervaci" jsem vypracovala samostatně pod vedením vedoucího diplomové práce a s použitím odborné literatury a dalších informačních zdrojů, které jsou citovány v práci a uvedeny v seznamu literatury na konci práce. Jako autorka uvedené diplomové práce dále prohlašuji, že jsem v souvislosti s jejím vytvořením neporušila autorská práva třetích osob.

V Praze dne \_\_\_\_\_

## **Poděkování**

Ráda bych touto cestou poděkovala vedoucímu práce Ing. Ondřeji Šimoníkovi za odborné vedení a rady, dále za cenné připomínky, přátelský přístup, mnoho praktických rad v laboratoři. Za pomoc při zpracování dat bych ráda poděkovala Ing. Jaromíru Ducháčkovi, Ph. D. Největší poděkování ovšem patří mé rodině a příteli, kteří mě celé roky podporovali.

# Integrita DNA spermií býků ve vztahu k jejich kryokonzervaci

## Souhrn

Při kryokonzervaci spermií dochází k řadě nežádoucích procesů, které mohou způsobit změnu mimo jiné i na jejich DNA. K poškození integrity DNA však může dojít ještě před procesem kryokonzervace. Jedná se například o vliv přítomnosti cytoplazmatické kapky, vyšší teploty v nadvarletí a věku. Mimo tyto uvedené vlivy je to rovněž laboratorní zpracovávání spermií, dále typ použitého kryoprotektantu, rychlost zmrazení a rozmrazování. Hodnocení integrity DNA se ukazuje velmi objektivním diagnostickým a prognostickým ukazatelem reprodukčního potenciálu, jelikož až 15 % plemeníků nemá konvenční analýzu v pořádku, ovšem hodnocení integrity DNA není jednoduché zařadit do konvenčního hodnocení kvůli nákladům na zařízení. Cílem práce bylo vyhodnotit vliv kryokonzervace na integritu DNA spermií býků a stanovit míru korelace dvou vybraných metod použitých pro její hodnocení, jelikož se v případě postupu využívající toluidinovou modř jedná o finančně dostupnou metodu s potenciálem využití v praxi.

Ejakulát byl odebírán standardním způsobem pěti býkům na inseminační stanici. Poté byl transportován do laboratoře, kde byl naředěn a zpracován před a následně po kryokonzervaci. Hodnocení integrity DNA probíhalo pomocí metody založené na principu barvení pomocí toluidinové modři (TB) a pomocí fluorescenční metody založené na metachromatických vlastnostech akridin oranž (AO), jejichž souvztažnost byla vyhodnocena korelační analýzou.

Vliv kryokonzervace na integritu DNA byl prokázán. Průměrná hodnota pozitivních spermií před kryokonzervací pomocí AO byla 1,375 % a spermií po kryokonzervaci 15,1 %. Při barvení pomocí TB bylo procento pozitivních spermií před kryokonzervací 9,2 % a spermií po kryokonzervaci 16,08 %. Dále byla zjištěna korelace metod AO a TB, přičemž Pearsonův koeficient korelace vyšel 0,64, což značí silnou závislost. Dále byla při porovnání býků potvrzena individuální variabilita.

Obě hypotézy byly potvrzeny. Kryokonzervace měla vliv na integritu DNA spermií býků. Použité metody spolu korelovaly, což představuje potenciální možnost použití méně nákladné metody založené na barvení toluidinovou modří v praxi.

**Klíčová slova:** DNA, kryokonzervace, reprodukce, spermie

# DNA integrity of bull sperm in relation to their cryopreservation

## Summary

During the cryopreservation of sperm, a number of unwanted processes may occur, which can cause, among other things, changes in their DNA. However, damage of DNA integrity may occur before the cryopreservation process. These include, for example, the influence of cytoplasmic drops, higher temperature in epididymis and age. In addition to these effects, it is also laboratory sperm processing, the type of cryoprotectant used, the rate of freezing and thawing. DNA integrity assessment is a very objective diagnostic and prognostic indicator of reproduction potential, as up to 15 % of breeding males do not have conventional analysis all right, but the DNA integrity assessment is not easy to include in a conventional evaluation due to high costs. The aim of the thesis was to evaluate the effect of cryopreservation on the integrity of bovine sperm DNA and to determine the correlation between the two selected methods, which were used for its evaluation., since When the toluidine blue procedure is a financially available method with potential for use in practice .

Ejaculate was collected in a standard way from five bulls at the insemination centre. Then, it was transported to a laboratory, where it was diluted and analyzed before and after cryopreservation. DNA integrity assessment was performed using a toluidine blue (TB) staining based method and a fluorescent method based on the metachromatic properties of acridine orange (AO). Their relationship was evaluated by correlation analysis.

The impact of cryopreservation on DNA integrity has been demonstrated. The mean value of positive sperm before cryopreservation with AO method was 1,375 % and 15,1 % after cryopreservation. For method using TB, the percentage of positive sperm before cryopreservation was 9,2 % and 16,08 % after cryopreservation. Furthermore, the correlation between AO and TB was found, with the Pearsons coefficient of correlation being 0,64, indicating a strong correlation. In addition, individual variability was confirmed when bulls were compared.

Both hypotheses have been confirmed. Cryopreservation had an effect on the integrity of bovine sperm DNA. The used methods correlated, suggesting the potential of using a cheaper method based on toluidine blue staining in practice.

**Keywords:** DNA, cryopreservation, reproduction, sperm

# Obsah

<b>1 Úvod.....</b>	<b>1</b>
<b>2 Cíl práce a hypotézy .....</b>	<b>2</b>
<b>3 Literární rešerše .....</b>	<b>3</b>
<b>3.1 Spermatogeneze.....</b>	<b>3</b>
3.1.1 Spermatocytogeneze .....	3
3.1.2 Spermiohistogeneze .....	4
<b>3.2 Spermie.....</b>	<b>5</b>
3.2.1 Hlavička .....	5
3.2.1.1 Jádno .....	6
3.2.1.2 Cytoskelet.....	7
3.2.1.3 Akrozom.....	7
3.2.2 Bičík.....	8
3.2.2.1 Krček (spojovací část).....	8
3.2.2.2 Střední část .....	9
3.2.2.3 Hlavní část.....	9
3.2.2.4 Koncová část .....	9
<b>3.3 Chromatin.....</b>	<b>9</b>
3.3.1 Defekty chromatinu .....	11
3.3.1.1 Leukocytospermie .....	12
3.3.1.2 Apoptóza .....	12
3.3.1.3 Oxidativní stres .....	12
3.3.1.4 Věk .....	13
3.3.1.5 Varikokéla .....	13
<b>3.4 Hodnocení integrity DNA spermíí .....</b>	<b>14</b>
3.4.1 Integrita DNA .....	14
3.4.1.1 Akridin oranž .....	15
3.4.1.2 SCSA.....	16
3.4.1.3 TUNEL.....	16
3.4.1.4 Toluidinová modř.....	16
<b>3.5 Kryokonzervace.....</b>	<b>18</b>
3.5.1 Ředění a chlazení .....	18
3.5.2 Mrazení .....	20
3.5.2.1 Pomalé zmrazení .....	20

3.5.2.2	Rychle zmrazení.....	21
3.5.3	Rozmrazování .....	21
<b>3.6</b>	<b>Vliv kryokonzervace na integritu DNA.....</b>	<b>22</b>
3.6.1	Apoptóza .....	22
3.6.2	Oxidativní stres .....	23
3.6.3	Chybná kondenzace chromatinu.....	23
3.6.4	Endogenní systém ochrany .....	24
<b>4</b>	<b>Materiál a metody .....</b>	<b>26</b>
<b>4.1</b>	<b>Odběr ejakulátu a jeho zpracování .....</b>	<b>26</b>
4.1.1	Hodnocení nativního ejakulátu .....	26
4.1.2	Hodnocení kryokonzervovaného ejakulátu .....	27
<b>4.2</b>	<b>Vlastní hodnocení.....</b>	<b>27</b>
4.2.1	Motilita.....	27
4.2.2	Integrita DNA .....	27
<b>4.3</b>	<b>Statistické hodnocení .....</b>	<b>29</b>
<b>5</b>	<b>Výsledky .....</b>	<b>30</b>
<b>5.1</b>	<b>Motilita .....</b>	<b>30</b>
<b>5.2</b>	<b>Integrita DNA .....</b>	<b>30</b>
5.2.1	Nativní vs kryokonzervované spermie .....	30
5.2.2	Porovnání metod AO vs TB.....	32
5.2.3	Výsledky analýz integrity DNA a individuální rozdíly býků.....	34
5.2.4	Vyřazený býk.....	34
<b>6</b>	<b>Diskuze .....</b>	<b>36</b>
<b>7</b>	<b>Závěr.....</b>	<b>41</b>
<b>8</b>	<b>Seznam literatury .....</b>	<b>42</b>
<b>9</b>	<b>Seznam grafů a tabulek .....</b>	<b>69</b>
<b>10</b>	<b>Přílohy .....</b>	<b>70</b>

# 1 Úvod

Umělá inseminace skotu je nejčastěji prováděna pomocí kryokonzervovaného semene. Jedná se o reprodukční biotechnologii, která přispěla k efektivnímu využití genetického potenciálu plemeníku, ke zlepšení genetické kvality chovných stád, dále umožnila používání spermatu bez přímého kontaktu mezi samicí a samcem a tím zabránila šíření pohlavně přenosných chorob. Kryokonzervace umožňuje dlouhodobé uchovávání spermií, transport po celém světě do určité míry se zachováním oplozovací schopnosti. Avšak kryokonzervace přináší i nevýhody. Jako to, že chlazení, zmrazení a rozmrazování obecně poškozují struktury spermií, což vede k ovlivnění jejich funkčních parametrů jako je mimo jiné integrita DNA.

K poškození integrity DNA může dojít v průběhu celého procesu kryokonzervace. Mezi hlavní negativní faktory působící na spermie v průběhu procesu kryokonzervace jsou: chladový šok, tvorba intracelulárních a extracelulárních ledových krystalků, dehydratace buněk a změny osmotického tlaku. Tyto vlivy dále vedou k nevratným změnám na strukturách spermií, ke změně morfologie a metabolických procesů. Za změnami v integritě DNA stojí zejména apoptotické změny a oxidativní stres.

Konvenční metody hodnocení kvality spermií zahrnují omezený soubor funkčních parametrů, ukázalo se, že i přes to, že vzorek splňoval parametry konvenční analýzy, tak samec může mít problém s fertilitou. Hlubší analýza spermií odhalila problémy s DNA, jelikož přibližně 15% neplodných samců má konvenční analýzu spermatu v pořádku. Stanovení integrity DNA spermií lze provést pomocí různých postupů např. použití chemikálie akridin oranž a sperm chromatin structure assay (SCSA), dále metoda TUNEL a reagentie toluidinová modř. Existují různé úrovně proveditelnosti a finanční náročnosti, přičemž mezi metody méně náročné co se týče nákladů i přístrojového vybavení patří akridin oranž a toluidinová modř.



## **2 Cíl práce a hypotézy**

Cílem práce bylo vyhodnotit vliv kryokonzervace na integritu DNA spermií býků a stanovit míru korelace dvou vybraných metod použitých pro její hodnocení

### **Hypotézy**

- Kryokonzervace bude mít vliv na integritu DNA spermií býků
- Výsledky metody založené na principu barvení pomocí toluidinové modři budou korelovat s fluorescenční metodou využívající specifické značení poškození DNA akridinovou oranží

## 3 Literární rešerše

### 3.1 Spermatogeneze

Spermatogeneze je biologický proces tvorby a vývoje spermií, který probíhá v semenných kanálcích varlat a nadvarlat (Xiao et al., 2013). Cílem spermatogeneze je tedy zajištění denní tvorby spermií, jejichž počet se u býka pohybuje okolo 2 - 3 miliard za celý život (De Jonge et Barratt, 2006). Samotná spermatogeneze se skládá ze dvou procesů – spermatocytogeneze a na ni navazující spermiohistogeneze. Spermatocytogeneze zahrnuje tvorbu spermatidy ze spermatogonie a trvá u býka přibližně 45 dní (Hafez et Hafez, 2000), spermiohistogeneze zahrnuje tvorbu spermie ze spermatidy a trvá přibližně 9 dní (Jelínek et al., 2003). Kontinuální produkce spermií je zajištěna díky trvalé obnově spermatogenních kmenových buněk a udržuje se po celou reprodukční dobu přibližně ve výši stovek milionů denně. Taková masivní proliferace a diferenciaci vyžaduje určitý stupeň kontroly kvality, který je zajištěn programovanou buněčnou smrtí (Sinha Hikim et Swerdloff, 1999).

#### 3.1.1 Spermatocytogeneze

Spermatocytogeneze je prvním vývojovým stádiem samčích pohlavních buněk, ve kterém dochází k dělení buněk od těch nejméně diferencovaných (Chenoweth et Lorton, 2014). Zahrnuje fázi rozmnožování, růstu a zrání (Jelínek et al., 2003).

Základ spermatocytogeneze je položen již v prvních dnech embryonálního vývoje jedince. V této době začnou primární zárodečné buňky migrovat z epiblastu do zadního střeva (Clark et Eddy, 1975). K pokračování vývoje dochází po narození, kdy se zárodečné buňky diferencují na spermatogonie typu A, které jsou mitoticky inaktivní až do předpubertálního období (Hafez et Hafez, 2000). V době puberty zvýšená produkce gonadotropních hormonů indukuje masivní proliferaci spermatogonií typu A a jejich diferenciaci na spermatogonie typu B pomocí mitózy. K produkci spermatogonií typu A dochází neustále a jenom část z nich se dále diferencuje (Xiao et al., 2013). V první fázi se spermatogonie B podrobují sérii replikačních cyklů DNA a mitózy, nejprve se spermatogoniální buňky dostávají do metafáze, kde dochází k buněčnému růstu a syntéze DNA. S fáze je nejdůležitějším krokem v procesu replikace genetického materiálu (Nussbaum et al., 2007), kdy se dvě vlákna rodičovské DNA uvolňují enzymy nazývanými DNA helikázy a následně dochází k replikaci. Replikační sekvence vytváří replikační vidlici ve tvaru Y. Dále se navazují proteiny na jednořetězcovou DNA, aby se zabránilo reformování dvojité šroubovice.

Výsledkem procesu replikace DNA jsou dva identické řetězce (Champe et al., 2005). Bez další syntézy DNA se výsledné sekundární spermatocyty znovu rozdělí, aby se vytvořily haploidní buňky známé jako spermatidy (Orthwein et al., 2015).

### 3.1.2 Spermiohistogeneze

Na spermatocytogenezi navazuje spermiohistogeneze, která se skládá ze čtyř fází: Golgiho fáze, fáze kaudální manžety, akrozomální fáze a fáze zrání. Před Golgiho fází dochází k řadě progresivních morfologických změn a fyziologických změn, přičemž mezi tyto změny patří zejména kondenzace nukleárního chromatinu (Jelínek et al., 2003).

Golgiho fáze je charakterizována tvorbou proakozomálních granulí v Golgiho aparátu. Proximální centriol migruje nejbližší k jádru (Hafez et Hafez, 2000), kde se předpokládá, že tvoří základ pro připojení bičíku k hlavičce (Meistrich et al., 2003).

Při fázi kaudální manžety dochází k alokaci, přesunu a navázání akrozomálních granulí na povrch spermatidového jádra (Chenoweth et Lorton, 2014). Tento proces pokračuje, dokud nejsou téměř dvě třetiny přední části každého spermatidového jádra kryté tenkým (Hafez et Hafez, 2000), dvojvrstevným membránovým obalem, který těsně přiléhá k jaderné membráně. Během této fáze se dále vyvíjí axonemální složky bičíku, které se tváří z prvků distálního centriolu (Haraguchi et al., 2005).

Třetí je akrozomální fáze, která je charakterizována výraznými změnami v jádru buňky (Kierszenbaum, 2002). Jaderné změny zahrnují kondenzaci chromatinu do hustých granulí a přetváření jádra do prodloužené, zploštělé struktury. V této fázi je většina jaderných histonů postupně nahrazována přechodnými proteiny (Meistrich et al., 2003). Akrozom, který těsně přiléhá k jádru, se také kondenzuje a prodlužuje, aby odpovídal tvaru jádra. Tyto modifikace jsou pravděpodobně vytvářeny okolními Sertoliho buňkami. Změny v jaderné morfologii jsou doprovázeny vytěsněním cytoplazmy do kaudální části jádra, kde obklopuje proximální část vyvíjejícího se bičíku (Kierszenbaum, 2002, Haraguchi et al., 2005).

Poslední fáze zrání zahrnuje finální přeměnu prodloužených spermatid do buněk, které mají být uvolněny do lumenu nadvarlete (Guraya, 1995). V jádře pokračuje kondenzace chromatinových granulí. Přechodné proteiny jsou nahrazeny protaminy. Dále se vytvoří vláknitý plášť, který pokrývá axonem (Kuster et al., 2004).

## 3.2 Spermie

Spermie se tvoří uvnitř stěn semenných kanálků, které obsahují komplexní řadu vyvíjejících se zárodečných buněk pocházejících ze samčích gamet (Hafez et Hafez, 2000), komplexním a časově náročným procesem známým spermatogeneze. Po transformaci a po uvolnění do lmenu semenných kanálků a následném průchodu do nadvarlete se spermie podrobí dalším změnám, např. získají schopnost být pohyblivé. V samičím pohlavním traktu podstupují další fyziologické a biochemické změny, aby získaly svou konečnou schopnost oplodnit vajíčko. Jedinečné morfologické vlastnosti spermií jsou pro buněčnou funkci nezbytné (Garner et Hafez, 2000). Vnější vlivy, např. genetika, teplota, hormonální modifikace, vnější chemikálie a modifikace DNA mohou negativně ovlivnit produkci normálních spermií (Chenoweth et Lorton, 2014).

Býčí spermie se jako u ostatních druhů skládají z hlavičky, spojovacího oddílu a bičíku. Hlavička je dlouhá 9,11  $\mu\text{m}$  a široká 5,05  $\mu\text{m}$ , bičík má spojovací část dlouhou 14,8  $\mu\text{m}$  a hlavní část 45 – 50  $\mu\text{m}$ . Délka celé spermie je tak 68,9-73,9  $\mu\text{m}$  (Věžník a kol., 2004). Zatímco hlavička obsahuje látky potřebné pro oplodnění vajíčka a otcovskou DNA, bičík obsahuje látky potřebné pro produkci a motilitu spermií (Johnson et al., 2011). Oba oddíly jsou pokryty plazmatickou membránou neboli plasmolemou. Hlavička hlodavců je háček (Olson et al., 2002), zatímco kopytníci a masožravci mají hlavičky spermií ve tvaru špachtle (Hazzouri et al., 2000). Významným rozdílem mezi spermií kopytníků a hlodavců je úplná absence centrozomu a centriolu u hlodavců, na rozdíl od redukované formy centrozomu s jediným proximálním centriolem u kopytníků (De Jonge et Barratt, 2006). Spojovací oddíl neboli krček spojuje hlavičku spermie s bičíkem a je rozdělen na střední, hlavní a koncovou část (Hafez et Hafez, 2000).

### 3.2.1 Hlavička

Hlavička savčích spermií je oválná, zploštělá a je rozdělena na dva segmenty na přední akrozóm a postakrozómovou část (Eddy, 2006), přičemž základem předního akrozomu je jádro (Chenoweth et Lorton, 2014). Tyto dva segmenty jsou obklopené středními částmi cytoskeletálních složek a cytoplazmy. Akrozomový uzávěr předního konce jádra a cytoskeletálních složek leží v úzkém prostoru mezi akrozomem a jádrem a mezi akrozomem a plazmatickou membránou (Brewer et al., 2002).

### 3.2.1.1 Jádro

Hlavním rysem hlavičky je oválné, zploštělé jádro pokryté perinukleárním obalem označovaným jako "perinukleární matrice", tvořící tuhou skořápku složenou ze strukturálních proteinů stabilizovaných disulfidovou vazbou (De Jonge et Barratt, 2006), obsahující vysoce kondenzovaný chromatin. Kondenzovaný chromatin se skládá především z deoxyribonukleové kyseliny (DNA) na kterou je navázána speciální třída základních proteinů, známé jako protaminy (Hafez et Hafez, 2000). Tento kondenzovaný stav DNA charakterizuje buňku jako nerozdělující a transkripčně inaktivní (Chenoweth et Lorton, 2014) a obsah DNA spermiového jádra je haploidní (Hafez et Hafez, 2000). Přes většinu jádra chybí jaderné póry a vnitřní a vnější membrány nukleárního obalu jsou od sebe vzdáleny 7 - 10 nm, zatímco ve většině ostatních buněk jsou jaderné póry bohaté a obě jaderné membrány jsou vzdáleny 40 - 60 nm (Neill, 2006).

Perinukleární matrice (PT) se dělí na tři segmenty: Subakrozomální vrstva je základem pro akrozomální segment hlavičky a slouží k ukotvení akrozomu. Golgiho vezikuly, které tvoří koncovou část na proximální polokouli a obsahují proteázy a receptory potřebné pro interakci spermií se zónou pellucidou (ZP). Vnitřní a vnější akrozomální membrány (IAM a OAM) drží uvnitř husté akrozomální matrice obsahující výše uvedené proteázy potřebné pro štěpení fertilizační štěrbiny v zóně pellucidě (ZP). Subakrozomální vrstva je fúzována s IAM a pravděpodobně stabilizuje receptorové molekuly na IAM, které jsou nezbytné pro sekundární vazbu hlavičky spermií na oblast zony pellucidy po akrozomální exocytóze. Při oplodnění zůstává IAM, zatímco OAM se ztrácí během akrozomální exocytózy vyvolané vazbou spermie - plazma - protein ZP3 (Yoshinaga et Toshimori, 2003). Ekvatoriální segment je komplex skládající se z PT, OAM a IAM, který nese receptorové molekuly zapojující se do počáteční vazby hlavičky spermií na membránu vaječné plazmy a obalu (Toshimori et al., 1992) a postakrozomální plášť (PAS) se považuje za komplex signálních proteinů, které jsou společně označovány jako SOAF (sperm oocyte activating factors) nebo spermie nesoucí faktory aktivující oocyty. Po spojení spermií s obalem se některé molekuly SOAF dispergují přes membránu, aby spustili signální dráhu vedoucí k aktivaci oocytů a zahájení zygotického vývoje, zatímco uvolněné PAS molekuly mohou zůstat spojené se spermiovým jádrem, protože se přeměňují na prvojádro (De Jonge et Barratt, 2006).

### 3.2.1.2 Cytoskelet

Cytoskeletální struktury jsou umístěny ve třech oblastech hlavičky savčích spermii. Subakrozomální cytoskelet je lokalizován mezi akrozomem a jádrem, cytoskelet postakrozomální leží mezi jádrem a plazmatickou membránou a paraakrozomální cytoskelet se nachází mezi přední špičkou a konvexním povrchem akrozomu a plazmatickou membránou (Dvorakova et al., 2005). Subakrozomální a postakrozomální cytoskelety mohou být dohromady označovány jako prenukleární theka (Seligman et al., 2004). Tento komplex pokrývá externí povrch jaderného obalu a skládá se z více proteinů (Kazemie et al., 1996). Subakrozomální cytoskelet je složen z amorfního, elektronově hustého materiálu a zabírá úzký prostor mezi vnitřní akrozomální membránou a vnější membránou jaderného obalu (Seligman et al., 2004). Postakrozomální cytoskelet se označuje jako postakrozomální plášť (Oko, 1998), rozvíjí se po prodloužení a zploštění hlavičky spermatidy, poskytuje zpevnění a podporu pro zadní část hlavičky spermii, aby se zabránilo jeho ohybu během pohybu spermii (Dvorakova et al., 2005). Další úloha perinukleární theky je spojení a stabilizace akrozomu, jádra a postakrozomální plazmové membrány (Neill, 2006).

Cytoskeletální proteiny obecně zahrnují aktin, proteiny vázající aktin, jako je spektrin, různé tubuliny a další (Brener et al., 2003). Existuje také člen rodiny proteinů spojených s membránou, které mají více domén spojenou s kinázovou aktivitou interakce protein - protein a člen rodiny proteinů spojujících aktiny. Proteiny, o kterých se uvádí, že jsou lokalizovány do subakrozomální oblasti, zahrnují proteiny vázající mastné kyseliny a variantu histonu (Seligman et al., 2004). Součásti cytoskeletu mají strukturální roli při definování tvaru hlavičky spermii a funkční roli při proniknutí spermii do vajíčka (Moore, 2001). Avšak jednotlivé části perinukleární theky mohou mít různé role (Camatini, 1989). Perforatorium se vyvíjí jako samostatná struktura na samém konci spermatogeneze. Vzhledem k tomu, že spermie v té době získaly svou konečnou podobu, perforatorium pravděpodobně nevytváří falciiformní tvar, ale může poskytnout strukturální výztuž pro stabilizaci tohoto tvaru (Neill, 2006).

### 3.2.1.3 Akrozom

Přední konec spermiového jádra je pokryt akrozomem, tenkým, dvojrstevným membránovým vakem (Hafez et al., 2000). Skládá se z vnitřní, vnější membrány a matrice naplněné proteázou (Schill et al., 1988). U savců akrozom překrývá přibližně 60% apikální oblasti spermiového jádra a hlavičky. Akrozomální membrána, která leží pod plazmatickou

membránou, je známá jako vnější akrozomální membrána, zatímco část nad jádrem se nazývá vnitřní akrozomální membrána. Zadní oblast akrozomu se nazývá jaderný kroužek neboli rovníkový segment (Ellis et al., 2002). Zadní oblast hlavičky spermíí (postakrozomální oblast) prochází změnami během dozrávání v nadvarleti (Berruti et Paiardi, 2011). Tyto změny hrají významnou roli ve vazbě spermie a fúzi plazmatickou membránou oocytů poté, co spermie pronikly přes corona radiata a zona pellucida po akrozomové reakci (Chenoweth et Lorton, 2014). Enzymy, o nichž se uvádí, že jsou přítomné v akrozomu, zahrnují: hyaluronidázu, proakrosin, akrosin, esterázy, neuraminidázu, kyselou fosfatázu, fosfolipázy, arylfosfatasu, arylamidázu, kolagenázu a koronový penetrační enzym (Hafez et Hafez, 2000). Hyaluronidáza se uvolňuje z akrozomu a hraje roli při dispergování nebo trávení extracelulární matrice ooumaforu (hrbolek vyčnívající do dutinky Graafova folikulu) v oocytu. Akrosin je přítomen v akrozomu jako proakrosin. Je spojen s vnitřní akrozomální membránou a je přeměněn na akrosin. Akrosin je enzym podobný trypsinu, který umožňuje proniknutí spermíí přes zonu pellucidu během fertilizace. Neuraminidáza také zjevně zlepšuje průchod spermíí přes oblast zona pellucida (Hirohashi, 2016).

### **3.2.2 Bičik**

Bičik se skládá ze čtyř segmentů: krčku (spojovací části), střední části, hlavní části a koncové části. Každý z těchto čtyř segmentů je obklopen běžnou buněčnou membránou, jejichž primární strukturní části jsou axonema, mitochondriální plášť, vnější hustá vlákna a vláknitý plášť (Eddy et al., 2003). Centrálně umístěná axonema se skládá z devíti rovnoměrně rozmístěných dvojitých mikrotubulů a centrálního páru elementárních mikrotubulů (Smith et Yang, 2004), které se rozkládají po celé délce bičiku (De Jonge et Barratt, 2006). Vnější hustá vlákna savčích spermíí mají velmi pozoruhodnou cytoskeletální strukturu, sestávající se z devíti vláken, které obklopují axonemu a procházejí krčkem, střední a hlavní částí (Jelínek et al., 2003). Defekty vnějších hustých vláken vedou k abnormální morfologii spermíí. Šikmo uspořádaný mitochondriální plášť obklopuje vnější hustá vlákna v prostřední části, zatímco vláknitý plášť obklopuje pouze vnější hustá vlákna v hlavní části. V koncové části se nacházejí pouze mikrotubuly (Chenoweth et Lorton, 2014).

#### **3.2.2.1 Krček (spojovací část)**

Krček je krátký spojovací segment mezi hlavičkou a bičíkem spermie, jsou propojeny bazální deskou na kaudálním konci jádra. Krček a axonema jsou tvořeny dvojicí centriolů, které se skládají z devíti kruhově uspořádaných mikrotubulárních tripletů (Kelly et Transler,

2004). Tyto dvě centrioly jsou přítomny ve spermatidě v době tvorby spermií. Distální centriol tvoří axonemu, zatímco proximální centriol je spojen s hlavičkou (Chenoweth et Lorton, 2014).

#### 3.2.2.2 Střední část

Jedná se o oblast mezi krčkem a Jensencovým prstencem. Prstenec je konstrukčním prvkem koncové části savčích spermií, který spojuje středovou a hlavní část. Střední oddíl je pokryt mitochondriálním pláštěm v podobě šroubovice (De Jonge et Barratt, 2006). Mitochondrie vytváří energii ve formě ATP, která je důležitá pro pohyb spermií (Inaba, 2003). Energie ve formě ATP se syntetizuje na vnitřní mitochondriální membráně. (De Jonge et Barratt, 2006). Každá mitochondrie spermie také nese několik kopií samčího mitochondriálního genomu. Z důvodů mutagenního oxidativního stresu, který se vyskytuje při zrání a oplození, dochází k eliminaci samčí mitochondriální DNA proteolýzou uvnitř oplodněného vajíčka (Chenoweth et Lorton, 2014).

#### 3.2.2.3 Hlavní část

Je nejdelší částí spermie, rozkládá se od prstence a přiléhá ke konci bičíku (Hafez et Hafez, 2000). Je centrálně složena z axonemy a přidružených hrubých vláken. Vláknitý plášť, složený ze dvou podélných pilířů probíhajících rovnoběžně s vnějšími hustými vlákny (třemi a osmi), spojenými na obou stranách řadou příčných žeber, zajišťuje stabilitu kontrakčních prvků (Miki et al., 2002). Proteiny ve vláknitém plášti uzavírají proteinové kinázy, které jsou nezbytné pro proces kapacitace spermií a hyperaktivace před oplodněním (De Jonge et Barratt, 2006).

#### 3.2.2.4 Koncová část

Poslední část spermie navazuje na distální konec vláknitého pláště a obsahuje pouze centrální axonemu pokrytou plazmatickou membránou (Hafez et Hafez, 2000).

### 3.3 Chromatin

Chromatin je vysoce organizovaná, kompaktní struktura sestávající se z DNA a heterogenních nukleových proteinů. Tato struktura je kondenzovaná a nerozpustná, chrání genetickou integritu a usnadňuje přenos otcovského genomu v samčím i samičím reprodukčním traktu (Manicardi et al., 1998; Wu et Chu, 2008). Genetická informace spermií se podrobuje replikaci a remodelování během mitotického a meiotického procesu buněčného



dělení - spermatogeneze. Před vznikem spermatidy je DNA obalena kolem somatických histonů (H1, H2A, H2B, H3, H4), postupně jsou histony nahrazeny přechodnými nukleárními proteiny (Rajender et al., 2011), které jsou následně nahrazeny protaminy v procesu zvaném protaminace a stabilizovány pomocí vodíkových můstků (Grootegoed et al., 2000). Protaminy jsou hlavní jaderné proteiny spojené s DNA (Shamsi et al., 2009). Jedná se o relativně malé, vysoce bazické proteiny, které jsou bohaté na arginin a cystein, dále na pozitivně nabitě argininové zbytky neutralizující negativní náboj fosfátového řetězce DNA a na cysteinové zbytky, které poskytují ještě vyšší úroveň kondenzace DNA a tím ji chrání před poškozením. Většina savců má pouze jeden aktivní protaminový gen, ale například myši a lidé mají dva (Dadoune, 2003). Existují dva obecné modely pro asociaci protaminů s DNA. Obecněji uznávaný model naznačuje, že protaminy jsou přítomny v rozšířené formě, což způsobuje, že DNA se zabalí do toroidních smyček. Druhý model naznačuje, že protaminy jsou zabaleny do šroubovice typu  $\alpha$  – helixu (Sutovsky et al., 2003). Pro integritu DNA je protaminace zásadní, protože dochází k reorganizaci chromatinu na kompaktní formu a činí ji tak odolnou na nukleázové štěpení (Fortes et al., 2012). Všechny tyto interakce činí ze savčí DNA nejkonzentrovanejší eukaryotickou DNA (Ward et Coffey, 1990). Ovšem ne všechny histony se přemění v protaminy, u savců zůstane 1 až 15 % jaderného proteinu jako histonů (Van der Heijden et al., 2008). DNA vázána k histonům umožňuje přístupnější čtecí rámec, je však více citlivá na degradaci nukleázovou aktivitou. Po penetraci spermií do oocyty se protaminy nahrazují mateřskými histony (Fortes et al., 2012).

Jelikož jsou spermie přibližně 10x menší než somatické buňky (Miller et al., 2010), musí být genomová DNA kondenzována do mnohem menšího objemu (Rajender et al., 2011). Proto je organizována speciálním způsobem, který udržuje chromatin v jádře kompaktní a stabilní. V roce 1991 navrhli Ward et Coffey tři úrovně organizace pro strukturu DNA: chromozomální ukotvení, které se týká připojení DNA k jadernému prstenci; vytvoření DNA smyčkových domén, kdy se DNA připojuje k nově přidané nukleární matici a nahrazení histonů protaminy, které kondenzují DNA na kompaktní formu (Ward et Coffey, 1991). Ovšem Fuentes-Mascorro et al. (2000) tvrdí, že chromatin je zabalen se speciálním typem malého bazického proteinu do těsného, téměř krystalického stavu, který je kompaktnější na rozdíl od mitotických chromozomů, zatímco DNA běžných somatických buněk je zabalena do nukleozomů (Pienta et Coffey, 1984). Tyto struktury se skládají z bílkovinného jádra tvořeného histony a nukleozomy jsou dále navinuty do pravidelných šroubovic nazývaných také solenoidy (Finch et Klug, 1976).

### 3.3.1 Defekty chromatinu

Defekty chromatinu jsou spojeny s přirozenými reprodukčními poruchami, jako je spontánní potrat a selhání asistované reprodukce (Cebesoy et al., 2006). Tyto defekty zahrnují narušení integrity DNA způsobené genetickými mutacemi, apoptózu, fragmentací nebo vystavením vlivu prostředí a volných radikálů (Andrabi, 2007). Ztráta integrity DNA spermie se může vyskytnout v jakékoliv fázi spermatogeneze, od transformace spermatogonálních zárodečných buněk až po ejakulované spermie (Boissonneault, 2002; McLay et Hugh, 2003; Tarozzi et al., 2007; Aitken et al., 2009).

Integrita genomu spermie je nezbytným předpokladem pro vznik zdravého potomstva a hodnocení spermatu by tak mělo zahrnovat její analýzu. Analýza integrity DNA je velmi objektivním diagnostickým a prognostickým ukazatelem reprodukčního potenciálu spermií (Evenson et Jost, 2000; Spano et al., 2000; Larson-Cook et al., 2003; Saleh et al., 2003), než konvenční analýza spermatu, zahrnující po odběru koncentraci spermií, objem, motilitu případně je doplněna morfologie či viabilita. Přibližně 15 % neplodných samců má konvenční analýzu spermatu v pořádku (Guzick et al., 1998). Poškozená DNA je úzce spojena s mnoha indikátory reprodukčního zdraví, včetně oplození, kvality embryí, implantace, spontánního potratu, vrozených malformací a nemocí potomků (Agarwal et Allameneni, 2004; Fernández-Gonzalez et al., 2008; Shamsi et al., 2008), proto test integrity DNA má velký potenciál jako test predikce oplození schopnosti pro *in vitro* i *in vivo* koncepci (Aitken et De Iuliis, 2010).

Některé postupy přípravy spermií a kryokonzervace způsobují snížení integrity chromatinu (Donnelly et al., 2001). Bylo prokázáno, že velmi rychlé zmrazení (v tekutém dusíku) způsobuje během kryokonzervace nejmenší poškození DNA (Duty et al., 2002; Revel et al., 2005). Mnoho léků jak komerčních, tak bylinných může také ovlivnit kvalitu spermatu a zvýšit poškození spermií DNA, například vysoká dávka třezalky byla dána do souvislosti se zvýšeným poškozením reprodukčních buněk (Ondrizek et al., 1999). V nedávné studii bylo prokázáno, že zvýšená teplota v nadvarleti nejen snižuje kvalitu parametrů spermatu, ale také ohrožuje integritu spermií chromatinu (Perez-Crepso et al., 2008). Dále byl prokázán vliv cytoplazmatické kapky (Fortes et al., 2012) a vyššího věku (Rubes et al., 2005). Studie Bungum et al. (2004) ukázala, že 30 % samců v umělé inseminaci má vysoké procento spermií s poškozenou DNA. Ve studiích Shamsi et al. (2010) bylo pozorováno, že u samic, které prodělaly potrat, mělo 47,7 % spermií vysoké poškození DNA. Také tyto plemence měly vysoké hladiny volných radikálů (reaktivní druhy kyslíku, ROS). Studie Greco et al. (2005)

ukázala, že poškození DNA je vyšší u ejakulovaných spermií ve srovnání se spermii vzatých biopsií z varlete.

#### 3.3.1.1 Leukocytospermie

Mnoho faktorů může indukovat poškození spermií, což může vést až k samčí neplodnosti. Jedním z těchto faktorů je leukocytospermie (Tomlinson et al., 1992). Jedná se o nárůst počtu leukocytů u spermatu v důsledku genitální infekce nebo zánětu (Sigman et Lopes, 1993). Leukocytospermie, která může způsobit tvorbu zánětlivých cytosinů je následována nadprodukcí reaktivních kyslíkových druhů (ROS), což přispívá ke zvýšení poškození DNA spermií (Fraga et al., 1996; Reichart et al., 2000). Ovšem studie Venkatesh et al. (2009) a Lewis et al. (2008) ukázala, že neexistuje korelace mezi zvýšenou tvorbou ROS a poškozením DNA.

#### 3.3.1.2 Apoptóza

Zárodečné buňky v savčích varlatech podstupují mnoho procesů dělení předtím, než dojde k jejich diferenciaci, která vede až ke zralým spermii. Dělení těchto zárodečných buněk je však tak intenzivní, že je zapotřebí mechanismus, jakým je apoptóza, který by redukoval jejich počet (Sinha Hikim et Swerdloff, 1999). Apoptóza je geneticky založený mechanismus buněčné smrti, který indukuje sled morfologických a biochemických změn vedoucích až k zániku buňky (Nagata, 1997). Apoptóza je zprostředkovávána membránovým proteinem Fas (Lee et al., 1997), který se váže na poškozenou DNA a dochází tak k počátku apoptické kaskády, která vede ke smrti spermie, jenž se následně označuje Fas pozitivní. Apoptóza začíná nejprve od bičíku spermie, kdy dojde ke snížení motility, aby nemohlo dojít k oplození vajíčka touto spermii s poškozenou DNA, a poté dojde ke smrti buňky (Aitken et Koppers, 2011). U samců s poškozenou DNA může být procento Fas pozitivních spermií až 50% (Huszar et al., 1997).

#### 3.3.1.3 Oxidativní stres

V posledních letech byl zaměřen výzkum na tvorbu reaktivních druhů kyslíku (ROS) v samčím reprodukčním traktu. Je to proto, že ROS jsou na vysoké úrovni potenciálně toxické pro kvalitu a funkci spermií (Saleh et Agarwal, 2002). ROS jsou vysoce reaktivní oxidační činidla, mezi které patří peroxid vodíku a superoxid (Warren et al., 1987). Přítomnost vysokých hladin ROS byla zaznamenána u spermií v rozmezí 25 až 40 % u neplodných samců (Padron et al., 1997). Za normálních podmínek chrání DNA spermií dva faktory

před poškozením – těsný obal DNA a antioxidanty přítomné v semenné plazmě (Twigg et al., 1998). Ovšem oxidativní stres (OS) vzniká jako důsledek nerovnováhy mezi generací ROS a antioxidačními aktivitami (Sikka, 2001). Obecně platí, že DNA báze a fosfodiesterové vazby jsou velmi náchylné k peroxidaci (Aitken et Krausz, 2001). Kromě toho jsou spermie obzvláště citlivé na poškození vyvolané OS, protože jejich plazmatické membrány obsahují velké množství polynenasycených mastných kyselin a jejich cytoplazma obsahuje nízké koncentrace enzymů (Sharma et Agarwal, 1996).

Vysoké hladiny ROS zprostředkovávají zvýšení poškození DNA ve formě modifikace všech bází, tvorbě míst bez bází, delecí, posunů rámců a křížení DNA (Duru et al., 2000). Jako biomarker pro tato poškození je považována tvorba 8-hydroxy-2-deoxyguanosinu (Ames et al., 1993; Barroso et al., 2000).

#### 3.3.1.4 Věk

I když produkce gamet u samců probíhá až do vysokého věku, tak jejich kvalita postupně klesá a snižuje se u nich plodnost (Wyrobek et al., 2006). Konečným výsledkem tohoto procesu je, že spermie produkované samci ve starším věku vykazují průměrnou úroveň poškození DNA, která je třikrát vyšší než u mladších jedinců, ovšem využívání mladých jedinců, kteří nedosáhli pohlavní zralosti je také spojena s vyšším výskytem poškození DNA spermií (Singh et al., 2003; Wyrobek et al., 2006). Věk samce má zásadní dopad na životaschopnost embrya a zdraví potomstva, dále je spojen s mírou spontánního potratu (Slama et al., 2005) a úmrtím plodu (Nybo Anderson et Hansen, 2004), dále s řadou vrozených vad, včetně rozštěpu rtů a štěpného patra (Bille et al., 2005).

#### 3.3.1.5 Varikokéla

Jak již bylo řečeno, během konečných stadií spermatogeneze jsou histony nahrazeny protaminy bohatými na cystein (Saleh et al., 2003), spermiová DNA se stává odolnější vůči poškození zprostředkovanému tepelným stresem a dalšími faktory, zejména ROS. Varikokéla může ovlivnit závěrečné stavy spermatogeneze a vést ke změnám u funkčních spermií (Barratt et al., 2010). Varikokéla je rozšíření žil v oblasti šourku, která vzniká většinou na levé straně skrota kvůli uspořádní krevního řečiště (Cockett et al., 1984). Teorie vzniku tohoto onemocnění zahrnují vliv retrográdního proudění, zvýšené teploty nadvarlete a poškození způsobené reaktivními kyslíkovými druhy (ROS) (Will et al., 2011). Po vzniku varikokély dochází k městnání krve v cévách, které zásobují varle (Cockett et al., 1984). Spermie samců s varikokélou vykazují prodloužené a ztenčené hlavičky, což se nazývá stresový model

spermie. Několik skutečností prokázalo vztah mezi varikokélou a neplodností a nedávné studie zvláště zdůraznily výrazné poškození DNA spermií (Wang et al., 2012).

### **3.4 Hodnocení integrity DNA spermií**

Kvalita ejakulátu je hlavním předpokladem úspěšné fertilizace. Pro stanovení oplozovací schopnosti spermií býka se používá řada zkoušek, dohromady umožňujících komplexní vyšetření odebraného ejakulátu a zhodnocení jeho vhodnosti pro výrobu inseminačních dávek. Nejdříve se provádí makroskopické zhodnocení ejakulátu, které zahrnuje zhodnocení objemu, konzistence, barvy a pachu. Následuje mikroskopické hodnocení, jenž je zaměřené především na kvalitu spermií. Mikroskopické hodnocení ejakulátu zahrnuje stanovení motility spermií, morfologické vyšetření spermií, biologické a biochemické zkoušky (Hafez et Hafez, 2000). Podrobněji bude dále popsáno z mikroskopického hodnocení motilita a integrity DNA, které jsou podstatné k praktické části práce.

#### **3.4.1 Integrita DNA**

V ejakulátu všech druhů savců je přítomna řada strukturálních modifikací spermií (Wiltbank et Parish, 1986) jako jsou morfologické tvary nebo velikost spermií, které se liší od normální struktury, která je charakteristická pro jednotlivé druhy (Saacke, 2008). Zdá se, že struktura a morfologie spermatu mají velký vliv na úspěšnost oplodnění a časný vývoj embrya (Borini et al., 2006).

Již více než 70 let existují rozsáhlé studie zahrnující identifikaci abnormální morfologie spermií a její vztah k reprodukci, avšak až v posledních několika letech je morfologie spojena s integritou DNA (Hauser et al., 2001; Enciso et al., 2010). Analýza morfologických abnormalit spermií v ejakulátu býků se stala běžnou veterinární praxí před prodejem býka, přirozenou plemenitbou a umělou inseminací (Calogero et al., 2001). V současné době existuje 25 rozpoznávaných odlišných abnormalit morfologie spermií býků (Kubo-Irie et al., 2005). Zatímco hlavní abnormality (teratoidní hlavičky, změna mitochondriálního oddílu, napučení, roztržení, uvolnění akrozomu a hlavičky) byly korelovány s poškozenou fertilitou (Sun et al., 2006), malé vady (tvarové změny bičíku, roztrhaný a torzní bičík) nemusí nutně znamenat narušení spermatogeneze a následné oplozovací schopnosti, přesto by mohly způsobovat snížení plodnosti, pokud by byly v ejakulátu přítomny ve velkých poměrech (Celik-Ozenci et al., 2004).

Při vzniku defektů spermií se uplatňuje vliv mnoho činitelů: toxicko-infekčního, fyzikálně-chemického, alimentárního a genetického. V závislosti na intenzitě mechanismu dochází k úplné nebo pouze k částečné neplodnosti (Agarwal et Said, 2003). Pro narušení DNA jsou nejpodstatnější změny hlavičky. U mladých býků se největší procento abnormalit projevuje již na počátku spermatogeneze (Fortes et al., 2012), jejichž výsledkem může být například změna tvaru a uspořádání akrozomálního systému nebo změna tvaru a při nerovnoměrném rozdělení DNA i vznik abnormální velikosti hlavičky, jenž je buď malá, nebo naopak obrovská. Při některých virových infekcích lze pozorovat vyšší % podíl zdeformovaných hlaviček spermií – oválné, zúžené, hruškovité (Gamčík et al., 1984). Některé abnormality spermií, jako jsou dvojité formy, úzké základové hlavičky, malé hlavičky, zkrácené bičíky a proximální cytoplazmatické kapky, byly spojeny pouze se spermiemi vykazujícími fragmentovanou DNA (Agarwal et Said, 2003).

Morfologie spermií a integrita jejich DNA, mezi nimiž existuje silný biologický vztah, mají vliv na plodnost býků (Evenson et Wixon, 2006). Hodnocení morfologie spermií a fragmentace DNA potencionálně zlepšit účinnost hodnocení kvality spermií u tohoto druhu (Agarwal et Said, 2003; Erenpreiss et al., 2006; Enciso et al., 2010) a proto při zjištění většího množství morfologických abnormalit hlavičky následuje analýza integrity DNA. V současné době je k dispozici mnoho testů integrity DNA spermií. Mezi nejčastěji používané metody patří akridin oranž (Morris et al., 2002), TUNEL (terminální deoxynukleotidyltransferázou zprostředkovaný dUDP koncovým značením) (Gorczyca et al., 1993), Toluidinová modř a analýza struktury chromatinu spermie (SCSA) (Evenson et al., 2002). Tyto testy obecně využívají rozdíl ve vlastnostech fragmentované a nefragmentované DNA (Erenpreisa et al., 1988). Pro praktickou část diplomové práce z důvodu dostupnosti a časové náročnosti budou použity metody akridin oranž a toluidinová modř, jejichž výsledky budou následně porovnány.

#### 3.4.1.1 Akridin oranž

Akridinová oranž je fluorescenční kationtové barvivo specifické k nukleové kyselině. Interaguje s jednovláknovou DNA. Při vazbě na DNA má excitační maximum při 502 nm a emisní maximum při 525 nm. Když se spojí s jednovláknovou DNA produkovanou jednovláknovými zlomy DNA, excitační maximum se posune na 460 nm (modré) a emisní maximum se posune na 650 nm (červená). Tento metachromatický posun je využit v testech integrity DNA pro kvantifikaci poškození DNA (Giwerzman et al., 2003). Akridinová oranž se váže na ds (double-stranded) DNA (nedenaturovaný) a vznikne zelená fluorescence,

zatímco při vazbě na oblasti jednovláknové DNA vznikne červená fluorescence. Tato technika využívá fluorescenční mikroskop a je rychlá, jednoduchá a nenákladná. Na druhé straně heterogenní zbarvení sklíčka a snížení intenzity fluorescence barvy krátce po obarvení jsou nevýhody této techniky. Další nevýhodou této barvicí techniky jsou nežřetelné barvy, jelikož jsou vidět i přechodné barvy mezi červenou a zelenou (Morris et al., 2002).

#### 3.4.1.2 SCSA

SCSA je jednou z analýz struktury chromatinu spermií. Jedná se o variantu barvení akridin oranž. Oproti vizuálnímu počítání červených a zelených buněk v testu AO je v SCSA detekována červozelená fluorescence pomocí průtokového cytometru. Výhodou tohoto testu je vysoká statistická přesnost, ale vyžaduje jisté technické vybavení v podobě průtokového cytometru a softwaru. Poměr červené fluorescence k celkové (součet červené a zelené fluorescence) udává index fragmentace DNA vzorku spermatu (Boe-Hansen et al., 2006). SCSA provádí vždy dvě nezávislá měření každého vzorku, aby bylo možné vyloučit ucpání průtokového kanálu nebo artefakt laserového driftu (Evenson, 2016).

#### 3.4.1.3 TUNEL

TUNEL (Terminal deoxy nucleotidyl transferase mediated dUTP nick end labeling assay) je metoda detekce apoptotické fragmentace DNA, široce používaná k identifikaci a kvantifikaci apoptotických buněk nebo ke zjištění nadměrného rozpadu DNA v jednotlivých buňkách (Guzick et al., 2001). Test se opírá o použití terminální deoxynukleotidyltransferázy (TdT), enzymu, který katalyzuje navázání deoxynukleotidů, značených fluorochromem nebo jiným markerem, na 3'-hydroxylové skupině při zakončení dvojitého řetězce DNA (Shamsi et al., 2011).

#### 3.4.1.4 Toluidinová modř

Toluidinová modř je základní barva, která má afinitu k nukleové kyselině, a proto se váže na jaderný materiál. Obarvuje fosfátové zbytky DNA spermií s volně baleným chromatinem a fragmentovanými konci (Guzick et al., 2001). Intenzivně fialové zbarvení se objevuje, když se obarví oblast bohatá na histony, zatímco světle modrá barva se vytváří interakcí s protaminy v chromatinu. TB má ortochromatický vrchol (modré monomerní zbarvení) při 630-660 nm a metachromatický vrchol (fialové oligopolymerní zbarvení) při 520-550 nm (Marcon et Boissonneault, 2004). Vzorek lze analyzovat pomocí běžného

mikroskopu, dále také pomocí průtokové cytometrie. Výsledky dobře korelují s SCSA a TUNEL (Lewis et al., 2008).

Metoda je jednoduchá, ekonomická a není náročná na čas. Nebýhoda této metody je v tom, že se často objevují spermie, které jsou na hranici TB pozitivní a TB negativní. Nejčastěji se objevují světle fialové a tmavě modré buňky. Je důležité stanovit hranici mezi TB pozitivní a TB negativní spermii. Stanovení špatné hranice může velmi ovlivnit výsledky (Marcon et Boissonneault, 2004).

### **Motilita**

Důležitým faktorem pro integritu DNA je motilita, která hraje zásadní roli v reprodukční schopnosti. Spermie získávají motilitu neboli pohyb a fertilitu tedy oplozovací schopnost v lumenu nadvarlete (Cornwall, 2014). Aktivace spermií není úplně dokončena po uvolnění z nadvarlete, ale je dále modifikována až po opuštění nadvarlete vlivem změn okolního prostředí a především díky semenné plazmě (Lüllmann-Rauch, 2012; Kunkitti et al., 2015). V pohlavní soustavě samice se pohyb spermií mění v důsledku působení sekretů samičího aparátu (Suarez et Pacey, 2006). Pohyb spermií je umožněn kmitáním bičíku, který tvoří více než 90 % délky spermií savců (Rajender et al., 2010). Paoli et al. (2011) popsali motilitu jako výsledek šíření příčných vln podél bičíku v proximálním až distálním směru vytvářející hydrodynamický impuls, který tlačí spermii přes samičí genitální trakt, aby pronikly k oocytu. Většina savčích spermií vykazuje dva typy fyziologické motility: aktivovanou motilitu, která je u čerstvě ejakulovaných spermií, a hyperaktivovanou motilitu, která je patrná u většiny spermií získaných z místa fertilizace (Suarez et Ho, 2003; Turner, 2003). Jakmile se spermie většiny druhů stanou hyperaktivními, rytmus bičíku se stává asymetrickým a s vyšší amplitudou, což vede ke kruhové trajektorii (Ishijima et al., 2002).

Motilita je zdaleka nejpoužívanějším měřítkem kvality spermatu (Louda et al., 2008). Hodnocení je velmi subjektivní a ovlivněno řadou faktorů, jako je typ ředidla, vybavení (skleněné nádoby, pipety atd.), přítomnost prostatické tekutiny, semenné pH, složení iontů a teplota. Je důležité používat vybavení zahřáté na teplotu 37 °C, aby se zabránilo chladovému šoku, který poškozuje spermie a následně zkresluje odhad motilit (Memon et al., 2007). Lze ji běžně hodnotit vizuálním odhadem procentního podílu pohyblivých buněk pomocí mikroskopu. Malá kapka spermatu se umístí na podložní sklíčko, přeneseno na vyhřevnou destičku na 37 °C a zkoumá se při zvětšení 200x nebo 400x (Rasul et al., 2001). Ve vzorku spermatu mohou existovat odchylky ve stupni progresivního pohybu buněk a v laterální dislokaci hlavy spermií (Celeghini et al., 2008). Subjektivní posouzení pohyblivosti spermií pomocí standardní mikroskopie může být velmi variabilní, a to i u vysoce



kvalifikovaných pracovníků (Utt, 2016), proto ve snaze eliminovat tyto odchylky byly vyvinuty mnohé objektivní techniky pro hodnocení motility spermií. Tyto techniky zahrnují počítačovou analýzu (CASA), časosběrnou mikrofotografii, videomikrografii a spektrofotometrii (Farrell et al., 1998). Nejvíce používaná CASA analyzuje pohyb velkého počtu spermií a z toho určuje řadu parametrů včetně procenta pohyblivých spermií, procenta progresivně pohyblivých spermií, průměrné rychlosti pohybu a křivkové rychlosti, dále CASA poskytuje rychlou, přesnou a ověřenou objektivní charakteristiku pohybu spermatu (Holt et Palomo, 1996).

### **3.5 Kryokonzervace**

Umělá inseminace skotu je nejčastěji prováděna pomocí kryokonzervovaného semene zahrnující ředění, chlazení, zmrazení a rozmrazování (Holt, 2000; O'ehninger et al., 2000; Andrabi, 2009). Jedná se o techniku, která umožnila používání spermatu bez přímého kontaktu mezi samicí a samcem a tím zabránila šíření pohlavně přenosných chorob, dále přispěla ke zlepšení genetické kvality chovných stád. Umožňuje především dlouhodobé uchovávání spermií se zachováním určité míry viability a dobré oplozovací schopnosti. V dřívější době se spermie uchovávaly v peletách, zatímco v současnosti se nejčastěji kryokonzervují v PVC pejetách (Bailey et al., 2000; Barbas et Mascarenhas, 2008; Layek et al., 2016). Během tohoto procesu spermie prodělávají chemické, osmotické, tepelný a mechanický stres, které působí na spermie ve všech fázích procesu různou intenzitou (Tahir et al., 1981; Andrabi et al., 2006).

#### **3.5.1 Ředění a chlazení**

Ředěním se vytvářejí podmínky pro přežívání spermií mimo organismu. Proces musí být zahájen do 15 minut po odběru spermatu. Teplota ředidla by měla být stejná jako je teplota ejakulátu kvůli zabránění chladovému šoku. Chladový šok zvýšit příjem vápníkových iontů spermií, který hraje zásadní roli v buněčné signalizaci. Díky tomu může být zpuštěna předčasná kapacitace, narušena termotaxe a následná signalizace mezi oocytem a spermií (Benson et al., 2012). Bylo zjištěno, že chlazení spermií býků z tělesné teploty na 5 °C rychlostí 10 °C/h je nejvhodnější k zabránění chladovému šoku (Parks, 1997). Ředidla mají za úkol nejen zvětšovat objem spermatu (Mutalik et al., 2014), ale hlavně vytvářet vhodné podmínky pro přežití spermií (Benson et al., 2012). Zajišťují spermiím zdroj energie (Rasul et al., 2000) a stabilizují jejich plazmatickou membránu tím, že do určité míry zabraňují změnám ve složení fosfolipidů v membráně během kryokonzervace (Justice et Christensen,

2013; Mutalik et al., 2014). Ředící roztok by ideálně měl mít pH v rozmezí 6,8 - 7,5, co nejvyšší rozpustnost ve vodě a minimální rozpustnost ve všech ostatních rozpouštědlech, minimální účinky soli a chemickou stabilitu (Andrabi, 2009). Kryokonzervační ředidla dále obsahují organické pufrы (Layek et al., 2016) a sacharidy, které zajišťují energii (Purdy, 2006; Justice et Christensen, 2013; Holt et Penfold, 2014). Další složkou ředidel jsou antibiotika, která zpomalují vývoj možných infekcí a dále zabraňují množení bakterií (Varner et al., 1998). V ředidlech se také nacházejí kryoprotektanty, což jsou látky, které výrazně napomáhají spermii vyrovnat se s procesem zmrazování, přežít mimo pohlavní aparát (Holt et Penfold, 2014), ovlivňují membránu, děje uvnitř buňky (Ciani et al., 2012), částečně zabranují k tvorbě ledových krystalků (Holt et Penfold, 2014) a značně ovlivňují jejich fyziologický stav po rozmrazení (Büyükleblebici et al., 2014). Kryoprotektanty dělíme podle mechanismu účinku na permeabilní a nepermeabilní (Layek et al., 2016). Permeabilní látky procházejí do spermie skrze plazmatickou membránu a ovlivňují buňku intra i extracelulárně (Ciani et al., 2012). Dochází ke zvýšení membránové fluidity díky přeskupení lipidů a proteinů (Holt, 1997). Nevýhodou je negativní působení na plazmatickou membránu spermie, díky tomu může docházet k její destabilizaci a následné denaturaci proteinů (Ciani et al., 2012). Nepermeabilní látky neprocházejí skrze membránu a působí tedy pouze extracelulárně, ale i přes to dokážou stabilizovat vnitřní prostředí spermií, tzv. obalí ledové krystalky a tím zabrání poškození membrány (Holt et Penfold, 2014).

Nejběžněji používaným permeabilním kryoprotektantem u býků je glycerol v koncentraci 7 - 8 % (Justice et Christensen, 2013), který chrání spermie, napomáhá stabilizovat plazmatickou membránu a omezuje tvorbu ledových krystalů během kryokonzervace (Purdy, 2006). Ovšem může na membráně působit i negativně a způsobovat poruchy fluidity. Proto se k němu přidávají další kryoprotektanty, které působí pouze extracelulárně jako vaječný žloutek nebo sojový lecitin (Amirat et al., 2004; Akhter et al., 2011).

Po zředění následuje zchlazení, kdy se sperma ochladí na teplotu 4 nebo 5 °C. Sperma je ochlazováno pomalu z důvodu zabránění chladového šoku. Předpokládá se, že ten má za následek narušení funkce membránových proteinů, které jsou nezbytné pro strukturální integritu nebo iontový metabolismus. Chladovému šoku je možné zabránit použitím vhodného ředidla, dodržením správného postupu (Purdy, 2006; Benson et al., 2012). Hlavní změny u spermií býků během zchlazování vznikají v rozmezí teplot 15 až 5 °C a nedochází k nim pod 0 °C (Watson, 2000). Rychlé chlazení snižuje štěpení fruktózy, absorpci kyslíku a syntézu ATP u spermií, což vede ke ztrátě energie a motility.

### 3.5.2 Mrazení

V kryokonzervaci spermií se především používají dvě konvenční techniky zmrazení: pomalé a rychlé mrazení (Di Santo et al., 2012). Zmrazováním jsou pozastaveny metabolické funkce spermií. Pokles teploty pod 4 °C pouze zpomaluje metabolickou aktivitu buňky, aby došlo k úplnému zastavení metabolických funkcí spermií, musí být zmrazeny na -196 °C (Medeiros et al., 2002). Při -196°C neprobíhá žádná biochemická aktivita, protože není k dispozici dostatečné množství tepelné energie pro chemické reakce a není přítomna kapalná voda, která je nezbytná pro metabolické procesy (Watson, 2000).

Během procesu mrazení se mohou vytvářet extracelulární a intracelulární ledové krystalky (Benson et al., 2012). Extracelulární ledové krystalky se tvoří z extracelulární vody. Tyto ledové krystaly zvyšují koncentraci rozpuštěných látek v ředidle, vytváří osmotický gradient na membráně a dochází k buněčné dehydrataci (Watson, 2000). Proto je důležité dodržovat optimální průběh mrazení, čím je průběh pomalejší, tím dochází k vyšší buněčné dehydrataci (Layek et al., 2016). Naopak při příliš rychlém zmrazení dochází k tvorbě intracelulárních krystalků (Tapia et al., 2012), při nichž dochází k zamrznutí vnitrobuněčné tekutiny. Intracelulární krystaly mohou narušovat buněčné struktury (Gürler et al., 2016), což může vést až k buněčné smrti (Hammerstedt et al., 1900).

#### 3.5.2.1 Pomalé zmrazení

Technika pomalého zmrazování navržená Behrmanem a Sawadou se sestává z progresivního chlazení spermií po dobu 2 až 4 hodin ve dvou nebo třech krocích, a to buď ručně nebo automaticky pomocí programovatelného mrazicího zařízení (Behrman et Sawada, 1966). Manuální metoda se provádí současným snižováním teploty spermatu a postupného přidávání kryoprotektantu. Následuje ponoření vzorků do kapalného dusíku (Said et al., 2010). Bylo prokázáno, že optimální počáteční rychlost ochlazování vzorku z pokojové teploty na 5 °C je 0,5 - 1 °C.min<sup>-1</sup> (Mahadevan et Trounson, 1984). Vzorek se pak zmrazí z 5 °C na -70 °C rychlostí 1 - 10 °C.min<sup>-1</sup>. Vzorek je následně ponořen do kapalného dusíku, který má teplotu -196 °C (Thachil et Jewett, 1981). U semiprogramovatelného mrazicího zařízení se kapalný dusík vnese do nádrže a po naprogramování zařízení se pomocí softwarového záznamu zaznamenává chlazení od 20 °C do -70 °C při rychlosti 1,5 °C.min<sup>-1</sup> a poté při 6 °C.min<sup>-1</sup>. Po ukončení zmrazení jsou spermie přeneseny do kapalného dusíku při -196 °C (Holt, 2000).

Pomalé zmrazení má své klady i zápory. Zvyšuje se koncentrace cukrů, solí a kryoprotektantu (například glycerolu), zatímco objem nezmražené frakce klesá. Zvýšení osmotického tlaku způsobuje dehydrataci buněk, dochází ale k minimální tvorbě intracelulárních ledových krystalků (Woelders, 2009).

### 3.5.2.2 Rychle zmrazení

Rychlé zmrazení bylo jako první navrženo Shermanem. Tato technika vyžaduje přímý kontakt mezi pejetami a parami tekutého dusíku po dobu 15 – 30 minut a následným ponořením do kapalného dusíku při -196 °C. Vnitřní dusíkové výpary mají tepelný gradient v závislosti na vzdálenosti a objemu kapaliny (Sherman, 1990). Vzorek se nejprve po kapkách smísí se stejným objemem studeného kryoprotektantu. Směs se přenesse do pejety a nechá se inkubovat při 4 °C po dobu 10 minut. Pejety se pak umístí ve vzdálenosti 15 - 20 cm nad hladinu kapalného dusíku (-70 °C) na 15 minut. Po této fázi jsou pejety ponořeny do kapalného dusíku. Během chlazení je vhodné umístit pejety ve vodorovné poloze, aby se minimalizoval rozdíl tepla mezi oběma konci (Fabbri et al., 2004).

I rychlé zmrazení má své klady a zápory. Často dochází ke změně membránových lipidů a proteinů. Membránové lipidy, které jsou normálně v kapalném krystalickém stavu, mohou ztuhnout, a následně dochází ke změně jejich funkce. Začínají procesy, jako je kryokapacitace a produkce reaktivních kyslíkových druhů (Woelders, 2009). Naopak někteří autoři uvádějí, že rychlé zmrazení omezuje tvorbu ledových krystalků a dochází k menšímu poškození DNA (Lin et Tsai, 2012).

V praxi je více využívaná technika rychlého mražení z důvodu lepší motility, viability a oplozovací schopnosti spermií po rozmrazení.

### 3.5.3 Rozmrazování

Fáze rozmrazování je stejně důležitá pro přežití spermií jako fáze zmrazení (Sukhato et al., 2001). Praktické rozmrazování spermatu skotu probíhá ve vodní lázni při teplotě 37 °C po dobu nejméně 30 s (Bhosrekar et al., 1994). Výsledek po rozmrazení závisí na tom, zda byla rychlost chlazení dostatečně vysoká, aby nedošlo k dehydrataci buněk nebo naopak příliš nízká, aby neindukovala tvorbu intracelulárních ledových krystalků. Dehydratace a vysoká koncentrace solí může vést ke ztrátě stability v membránách nebo k denaturaci bílkovin (Woelders, 2009). Je důležité dodržovat správný postup rozmrazování (Rasul et al., 2000), aby se zabránilo rekrystalizaci jakéhokoli intracelulárního ledu přítomného ve spermiích.

Nesprávný postup způsobuje rychlý pokles objemu buněk přibližně na 50 % jejich původního objemu, což vede ke strukturální deformaci buněk (Woelders, 2009).

### **3.6 Vliv kryokonzervace na integritu DNA**

I když je kryokonzervace neocenitelnou technikou pro chov, přináší také řadu nevýhod. Velkou překážkou při využívání kryokonzervovaného spermatu mnoha druhů je to, že chlazení, zmrazení a rozmrazování obecně poškozují struktury spermií, což vede ke snížení životaschopnosti a pohyblivosti spermií až o 50 % (Hammerstedt et al., 1990). V důsledku toho je kvalita spermií po kryokonzervaci nižší než u čerstvého spermatu většiny druhů (Salamon et Maxwell, 1995; Watson, 1995). Několik faktorů, jako je typ použitého kryoprotektantu, rychlost zmrazení a rozmrazování, hladina antioxidantů a fyzikální vlastnosti spermií mohou ovlivnit kryokonzervaci spermií. Složení lipidů je spojeno s tolerancí spermií na kryokonzervaci a pro druhy, u kterých je molární poměr cholesterolu k fosfolipidům a stupeň nasycených mastných kyselin vysoký (Watson et Morris, 1987), byla zjištěna větší rezistence savčích spermií k chladovému šoku, u býků je ovšem nižší obsah cholesterolu a tak jsou spermiie náchylnější na chladový šok (Lin et Tsai, 2012).

Nejčastěji k poškození spermií dochází během zmrazování a rozmrazování, kdy se může objevit několik negativních procesů, jako je chladový šok s tvorbou intracelulárních a extracelulárních ledových krystalků, dehydratace buněk a osmotický šok (Stanic et al., 2000). V těchto fázích také dochází k morfologickým změnám hlavičky, které mají dále za následek poškození DNA (Lin et Tsai, 2012). Dále bylo prokázáno, že DNA byla výrazně poškozena rychlým zmrazením a následným pomalým rozmrazením. Naproti tomu rychlé zmrazení, po němž následovalo rychlé rozmrazování, pomalé zmrazení následované pomalým rozmrazením nebo pomalé zmrazení a následné rychlé rozmrazení, nezpůsobilo poškození DNA (Lewis, 2003).

Při kryokonzervaci tedy dochází k mnoha nežádoucím procesům, které mohou ovlivnit např. morfologii, metabolismus a také změnu na DNA. Za změnou DNA stojí zejména nežádoucí apoptóza, oxidativní stres a chybná kondenzace chromatinu.

#### **3.6.1 Apoptóza**

Apoptóza je přirozený proces, který se vyskytuje po celou dobu spermatogeneze, avšak nežádoucí apoptóza, při které nejsou buňky zcela zničeny, se podílí na tvorbě spermií, které vykazují poškozenou DNA v ejakulátu (Sakkas et al., 2003). Kryokonzervace zvyšuje aktivaci konkrétních cysteinových proteáz řízených kyselinou aspartovou. Tyto proteázy

indukují markery pro apoptotickou kaskádu, jak u lidských (Paasch et al., 2004; Wundrich et al., 2006), tak u býčích spermií (Martin et al., 2004). Kaspázy, zvláště kaspázy 1, 3, 8 a 9, hrají klíčovou roli v buněčné apoptické kaskádě a následné buněčné smrti (Thornberry et Lazebnik, 1998). Díky vysoké kondenzaci chromatinu nedochází k přímému poškození DNA pomocí apoptotických endonukleáz jako u somatických buněk, ale dochází ke zvýšení ROS v mitochondriích jako následek indukce apoptotické kaskády, následně ROS indukují poškození chromatinu (Aitken et Koppers, 2011), např. tvorbou míst bez bází, delecí a křížením DNA (Duru et al., 2000).

### **3.6.2 Oxidativní stres**

Oxidativní stres představuje další potenciální mechanismus, kterým může být u spermií indukována fragmentace DNA (Aitken et al., 2009). Proces kryokonzervace zvyšuje úroveň tvorby reaktivních kyslíkových druhů (ROS) u spermií (Mazzilli et al., 1995; Wang et al., 1997; Irvine et al., 2000; Baumber et al., 2003; Peris et al., 2007). Ke zvýšené tvorbě dochází kvůli zvýšené produkci superoxidového aniontu (De Iuliis et al., 2006), který je schopen být buď spontánně nebo enzymaticky přetvořen na peroxid vodíku ( $H_2O_2$ ). Vzhledem k vysoké oxidační aktivitě je  $H_2O_2$  považován za zvláště cytotoxický (Alvarez et al., 1987). Superoxid a  $H_2O_2$  mohou také vytvářet extrémně škodlivý hydroxylový radikál, který je schopen narušit téměř všechny buněčné komponenty (De Lamirande et al., 1997).

Nadprodukcí ROS může pozitivně ovlivnit fytoestrogen genistein, který se nachází v poměrně vysokých koncentracích v sóji (Zielonka et al., 2003) a byl v poslední době uváděn jako potenciální antioxidant u spermií (Bennetts et al., 2008). Také bylo prokázáno, že poskytuje nejen ochranu buněk před oxidativním stresem a lipidovou peroxidací, ale také snižuje výslednou fragmentaci DNA. Vzorky ošetřené genisteinem také vykazují vyšší motilitu a viabilitu po rozmrazení (Liang et al., 2008).

### **3.6.3 Chybná kondenzace chromatinu**

Neposledním významným problémem, ke kterému může dojít vlivem kryokonzervace je chybná kondenzace chromatinu. Za normálních podmínek je chromatin spermie nejkonzentrovanejší z celé eukaryotické DNA. Zejména proces zmrazení – rozmrazování má vliv na kondenzaci chromatinu. Za optimálních fyziologických podmínek je podíl protaminu P1 a protaminu P2 1:1, ovšem náhlá změna teploty z  $-196\text{ }^{\circ}\text{C}$  na  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$  může tento poměr narušit. Pokud dojde k narušení poměru P1 a P2 ku prospěchu P2 dochází ke snížení stability DNA, ovšem pokud se změní poměr ve prospěch P1, dochází ke zvýšení stability DNA,

pravděpodobně kvůli většímu zhuštění DNA chromatinu. Častěji ovšem dochází k navýšení protaminu P2 a to ze 72 % případů (Gosálvez et al., 2011).

Dále může během kryokonzervace vlivem hyperosmotického stresu docházet k fragmentaci DNA nebo k inhibici reparačních mechanismů, jenž vedou k širším genomovým aberacím (Kültz et Chakravarty, 2001). Hyperosmotický tlak je způsobován třemi mechanismy. První jsou mechanické deformace genomu vlivem zvýšeného iontového tlaku na pevný chromatinový obal vzniklého kvůli buněčnému smrštění (Kopeika et al., 2014). Druhý mechanismus je na principu vzniku oxidativního stresu, který může způsobit přerušování šroubovice DNA (McCarthy et al., 2010) a třetí, při kterém dochází k produkci dvojitých řetězců, kvůli narušení rovnováhy mezi opravou a poškozením DNA nebo zvýšeným ukládáním nukleáz či volných radikálů do určitých oblastí genomu (Kopeika et al., 2014). Dochází ke snížení fertilizace, kvalitě embrya a vyšší incidenci potratů.

K chybné kondenzaci chromatinu může také dojít vlivem pH, kdy extrémně vysokého nebo nízkého pH destabilizují  $\alpha$  helix DNA (Williams et al., 2001). Neutrální nebo kyselé pH způsobuje více chromozomálních defektů během kryokonzervace než pH alkalické (Kaneko et al., 2003). Na strukturu chromatinu mohou negativně působit i některé látky. Např. Dimethyl sulfoxid způsobuje metylaci DNA nebo konformační změny v DNA (Nelson et Johnson, 1970), může tak narušit dvojitý zlom DNA pomocí případné konformace heterochromatinu (Kashino et al., 2010). Glycerol může také narušit konformaci DNA a má destabilizující účinek (Nakanishi et al., 1974).

#### **3.6.4 Endogenní systém ochrany**

Semeno býka má svůj endogenní systém ochrany sestávající se z enzymatických (kataláza, glutathionperoxidáza, superoxidodismutáza) a neenzymatických (vitamín C, glutathion, cystein) antioxidantů proti molekulám ROS (Andrabi, 2009). Jak vitamín C, tak kataláza redukuje tvorbu ROS (Li et al., 2007; Taylor et al., 2009). Vlivem kryokonzervace však dochází k nadměrné produkci molekul ROS (Kadirvel et al., 2009) a snižují se hladiny endogenních antioxidantů (Stradaioli et al., 2007) u býčích spermií. Tento systém endogenní ochrany se tak stává nedostatečný (Kadirvel et al., 2009). Z tohoto důvodu se zkoumá přidávání vhodných antioxidantů pro zlepšení kvality a plodnosti kryokonzervovaného býčího spermatu (Ansari et al., 2010, Ansari et al., 2011). Podle Bucak et al. (2010) však přidání antioxidantů ke zmrazeným spermiím nemá vliv na tvorbu ROS ani na celkovou antioxidační aktivitu, ale má pozitivní vliv na integritu plazmatické membrány. Doporučuje se použití glutathionu a cysteinu, jelikož mohou zlepšit životaschopnost spermií a funkční integritu.

Cystein je aminokyselina obsahující síru, která se přirozeně vyskytuje v semenné plazmě a spermiové nukleové kyselině, která udržuje integritu DNA a také působí jako antioxidant přímo nebo i nepřímo prostřednictvím intracelulárních antioxidantů, které chrání nežádoucí účinky zprostředkované ROS (Perumal et al., 2011; Topraggaleh et al., 2014).



## 4 Materiál a metody

Býčí ejakulátu byl odebírán na inseminačních stanicích a poté transportován do laboratoře, kde byl zpracován a kryokonzervován. Hodnocení integrity DNA bylo prováděno v různých fázích procesu - před naředěním semene a následně po rozmrazení.

Pro hodnocení integrity DNA spermií bylo využito dvou odlišných postupů. První funguje na fluorescenčním principu za využití akridinové oranž. Druhé hodnocení tohoto kvalitativního parametru spermií je založeno na specifických vlastnostech toluidinové modři a hodnocení probíhalo pomocí světelného mikroskopu. Mimo integritu DNA spermií byla pro kontrolu všeobecné kvality vzorků hodnocena motilita spermií.

### 4.1 Odběr ejakulátu a jeho zpracování

Ejakulát byl odebírán 1 býku na inseminační stanici Natural s.r.o., Hradištko pod Medníkem a 4 býkům na inseminační stanici CRV Czech Republic s.r.o., Zásmyky standardním způsobem. Každý ejakulát byl podroben základnímu posouzení vyškoleným laborantem inseminační stanice. Byly hodnoceny tyto parametry: objem ejakulátu, koncentrace spermií a procento pohyblivých spermií. K experimentu byl použit pouze ejakulát, který splňoval limit koncentrace spermií  $\geq 0,7 \times 10^9/\text{ml}$  a procento pohyblivých spermií  $\geq 70\%$ .

Poté byl ejakulát transportován při teplotě 5°C do laboratoře KVD ČZU, kde byl následně naředěn na koncentraci  $10 \times 10^6/\text{ml}$  a zpracován. Ejakulát, který nebyl použit k okamžitému zpracování, byl rozdělen na objemově shodné díly a naředěn ředidlem Optixcell (IMV Technologies, L'Eigle, Francie) na konečnou koncentraci  $30 \times 10^6/\text{pejeta}$  (0,25 ml) a ekvilibrován v pejetách při teplotě 5 °C po dobu 2 hodin. Po uplynutí této doby byl ejakulát naplněn do pejet. Pejety byly následně ponechány 20 minut nad parami tekutého dusíku LN2 a poté ponořeny přímo do kapalného dusíku (-196 °C) a uchovávány v kontejneru Cryo diffusion 49 (Lery – Francie).

#### 4.1.1 Hodnocení nativního ejakulátu

Hodnocení bylo prováděno po přivezení ejakulátu z inseminační stanice. Ejakulát byl zahřán v inkubátoru (Incucell 55, BMT Medical Technology s.r.o., Brno) na teplotu 37 °C po dobu 10 minut. Následně naředěn na koncentraci  $10 \times 10^6/\text{ml}$  pomocí DPBS (Dulbecco's phosphate-buffered saline, složení - 2.7 mM KCl, 1.5 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 136.9 mM NaCl, 8.9 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>\*7H<sub>2</sub>O) (Sigma-Aldrich s.r.o., Praha, Česká republika) a podroben hodnocení.

#### **4.1.2 Hodnocení kryokonzervovaného ejakulátu**

Pejety byly rozmrazeny standardním způsobem ve vodní lázni (Memmert, Unimed, Praha) při teplotě 37 °C po dobu 30 vteřin. Následně byl ejakulát naředěn DPBS (Dulbecco's phosphate-buffered saline) (Sigma-Aldrich s.r.o., Praha, Česká republika) na koncentraci  $10 \times 10^6$ /ml a podroben hodnocení.

### **4.2 Vlastní hodnocení**

#### **4.2.1 Motilita**

Motilita spermií byla hodnocena pomocí systému CASA (Computer Assisted Sperm Analysis), který se skládal z těchto částí - stereo mikroskopu Nikon Eclipse E600 (Nikon, Tokyo, Japonsko) s výhřevnou destičkou (TokaiHeat, Japonsko), kamery DMK 23UM021 (Imaging Source, Brémy, Německo) a počítačového softwaru - NIS Elements Ar 4.50 (Laboratory Imaging, s.r.o., Praha, Česká republika).

Rozmrazené vzorky spermií byly přeneseny do zkumavek o objemu 1,5 ml a naředěné pomocí DPBS (Dulbecco's phosphate-buffered saline, složení - 2.7 mM KCl, 1.5 mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 136.9 mM NaCl, 8.9 mM  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ) (Sigma-Aldrich s.r.o., Praha, Česká republika) na koncentraci  $20 \times 10^6$ /ml, následně inkubovány po dobu 10 minut při teplotě 37 °C. Po uplynuté době a šetrné homogenizaci bylo přeneseno 5  $\mu\text{l}$  vzorku do komůrky typu Makler® (SefiMedical, Haifa, Izrael) o hloubce 20  $\mu\text{m}$ . Pohyb spermií byl snímán objektivem 10x s negativním fázovým kontrastem v šesti různých zorných polích. Záznam proběhl pomocí kamery o frekvenci 60 snímků za sekundu.

V experimentu bylo hodnoceno pouze celkové procento motilních spermií na základě prahu pohyblivých spermií VAP (průměrná rychlost)  $> 10 \mu\text{m/s}$ , která sloužila jako orientační hodnota pro další zpracování. K experimentu byl použit vzorek s více než 30 % pohyblivých spermií.

#### **4.2.2 Integrita DNA**

Metodika hodnocení integrity DNA pomocí akridin oranž a toluidinové modři musela být po několik měsíců testována. Základ obou technik byl sestaven z vědeckých článků a z teoretické a praktické konzultace na oddělení Reprodukční biologie, Biotechnologický ústav, Akademie věd ČR, v.v.i. Ovšem obě techniky musely projít mnoha modifikacemi během dvou měsíců, aby podávaly hodnocení způsobitelné výsledky.

### Akridin oranž

Z 20  $\mu$ l naředěných (koncentrace  $10 \times 10^6$ /ml) a homogenizovaných spermií byl vytvořen roztěr na podložní sklíčko a nechal se zaschnout na vzduchu při pokojové teplotě. Po zaschnutí byl pomocí PAP PEN (Sigma-Aldrich s.r.o., Praha, Česká republika) vytvořen obdélník o rozměru cca 3x2 cm. Následně byla provedena fixace vzorku 70  $\mu$ l Carnoy's roztoku (1 díl kyseliny octové:3 díly metanolu) (Sigma-Aldrich s.r.o., Praha, Česká republika) ve vlhké komůrce při teplotě 4 °C po dobu minimálně dvou hodin. Po fixaci následovalo opláchnutí pomocí PBS (Phosphate Buffered Saline, 0,01M, Sigma-Aldrich s.r.o., Praha, Česká republika) 2x1 ml. Vlastní barvení vzorku bylo provedeno 200  $\mu$ l akridin oranž (50  $\mu$ g na ml barvicího pufru\*) po dobu 10 minut při pokojové teplotě. Opět následovalo opláchnutí pomocí PBS (Phosphate Buffered Saline, 0,01M, Sigma-Aldrich s.r.o., Praha, Česká republika) 2x1 ml. Finální hodnocení (500 buněk) probíhalo pomocí fluorescenčního mikroskopu Nikon Eclipse E600/Nikon Eclipse TI (Nikon, Tokyo, Japonsko) – fluorescenční filtr pro vlnovou délku 488 nm, zvětšení 400x. Jako pozitivní byly hodnocené oranžové a červené spermie, jako negativní spermie zelené.

\* na 100 ml, pH6

0.2M Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	2,8392 g
1mM EDTA	0,0372 g
0.15 M NaCl	0.8766 g
0,1 M citric acid monohydrate	2,101 g

### Toluidinová modř

Z 20  $\mu$ l naředěných (koncentrace  $10 \times 10^6$ / ml) a homogenizovaných spermií byl vytvořen roztěr na podložní sklíčko a nechal se zaschnout na vzduchu při pokojové teplotě. Po zaschnutí byla provedena fixace čerstvě připraveným roztokem ethanolu 96 % a acetonu (Sigma-Aldrich s.r.o., Praha, Česká republika) v poměru 1:1 po dobu 30 minut v kyvetě při teplotě 4 °C. Po 30 minutách následovala inkubace 0,1 N HCl (1,2 ml) (Sigma-Aldrich s.r.o., Praha, Česká republika) po dobu 10 minut ve vlhké komůrce opět při teplotě 4 °C. Po inkubaci byl vzorek promýván v kyvetě na třepačce (SK-L-180-E, Analog linear shaker) pomocí demi H<sub>2</sub>O 3x po dobu 2 minuty. Barvení vzorku bylo provedeno 0,1 % toluidinové

modři v McIlvaine\* (pH 4,0, 1,2 ml) po dobu 10 minut při pokojové teplotě. Po obarvení byl preparát opláchnut H<sub>2</sub>O. Finální hodnocení (500 buněk) bylo prováděno pomocí světelného mikroskopu Nikon Eclipse E200 (Nikon, Tokio, Japonsko) pod zvětšením 400x. Kde jako pozitivní byly hodnoceny tmavě modré spermie a jako negativní světle modré spermie.

\* McIlvaine, Mix A+B (7,71 : 12,29 ml), pH7

Roztok A	5,068 g	NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> xH <sub>2</sub> O/100 ml
Roztok B	1,9212 g	Kyselina citrónová/100 ml

### 4.3 Statistické hodnocení

Získaná data byla statisticky analyzována pomocí softwaru SAS 9.3 (Statistical Analysis System). Ke statistickému hodnocení nebyl použit býk z inseminační stanice Natural s.r.o., Hradištko pod Medníkem, jelikož se jednalo o vyřazeného býka, který byl použit pouze pro kontrolu ostatních vzorků. Do statistického hodnocení byli tedy zahrnuti 4 býci z inseminační stanice CRV Czech Republic s.r.o., Zásmyky.

Hodnocení vlivu kryokonzervace na integritu DNA bylo vyhodnoceno vícefaktorovou analýzou rozptylu – ANOVA. Jako závisle proměnné byly hodnoceny parametry Procento pozitivních spermií, jako nezávisle proměnné nativní a kryokonzervované vzorky. Před samotným testováním byla ověřena normalita dat a homoskedasticita. Hladina významnosti  $p = 0,001$ .

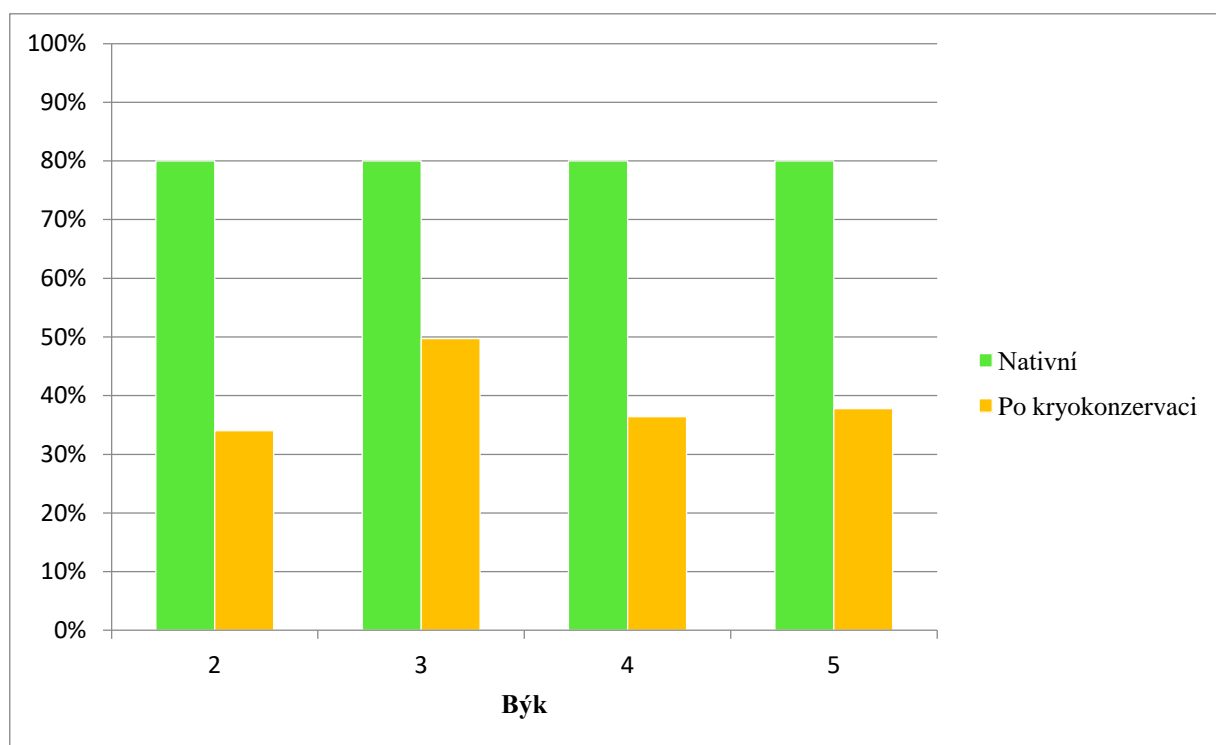
K hodnocení korelace metod akridine oranž a toluidinové modři byla použita korelační analýza. Síla závislosti byla vyjádřena korelačním koeficientem.

Dále byl hodnocen rozdíl integrity DNA po kryokonzervaci mezi jednotlivými býky z inseminační stanice CRV Czech Republic s.r.o., Zásmyky. K hodnocení byla použita vícefaktorová analýza rozptylu – ANOVA. Před samotným testováním byla ověřena normalita dat a homoskedasticita. Jako závisle proměnné byly hodnoceny parametry procenta pozitivních spermií, jako nezávisle proměnné býk 2, 3, 4, 5. Hladina významnosti  $p = 0,001$ .

## 5 Výsledky

### 5.1 Motilita

Motilita spermií nativního ejakulátu byla hodnocena u 5 býků, ovšem býk číslo 1 byl mimo standardní limity, a tak jsou v grafu uvedeni ti, kteří byli dále podrobeni statistickému hodnocení na integritu DNA. Motilita ejakulátu byla po odběru > 80 %. Po kryokonzervaci bylo hodnoceno pouze celkové procento motilních spermií pomocí CASA, která sloužila pouze pro kontrolní účely, aby byl použit k dalšímu zpracování vzorek s motilitou > 30 %. U každého býka bylo hodnoceno 8 vzorků, přičemž průměrné hodnoty vyjadřuje graf 1. Nejvyšší % celkové motility po kryokonzervaci vykazoval býk číslo 3 – 49,75 %, naopak nejnižší býk číslo 2 – 34 %. Býci 4 a 5 vykazovali hodnoty podobné a to okolo 36,5 %.



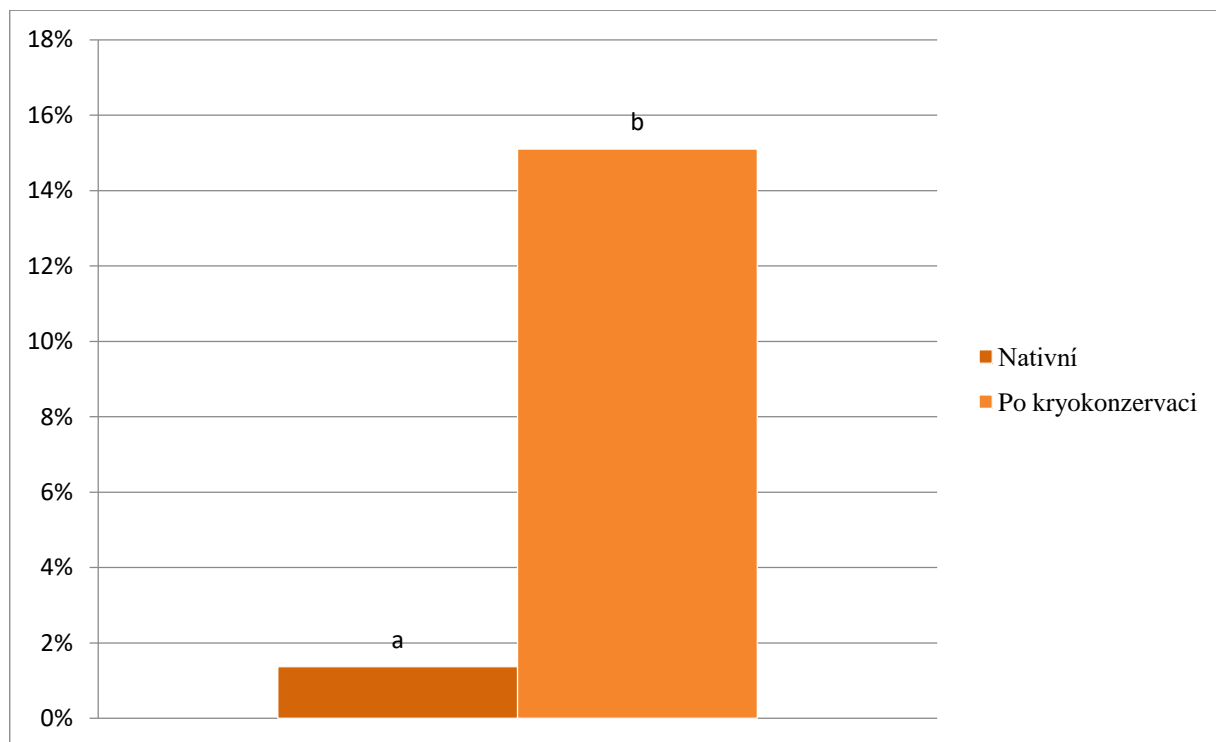
**Graf 1:** Procentuální zastoupení motilních spermií před a po kryokonzervaci

### 5.2 Integrita DNA

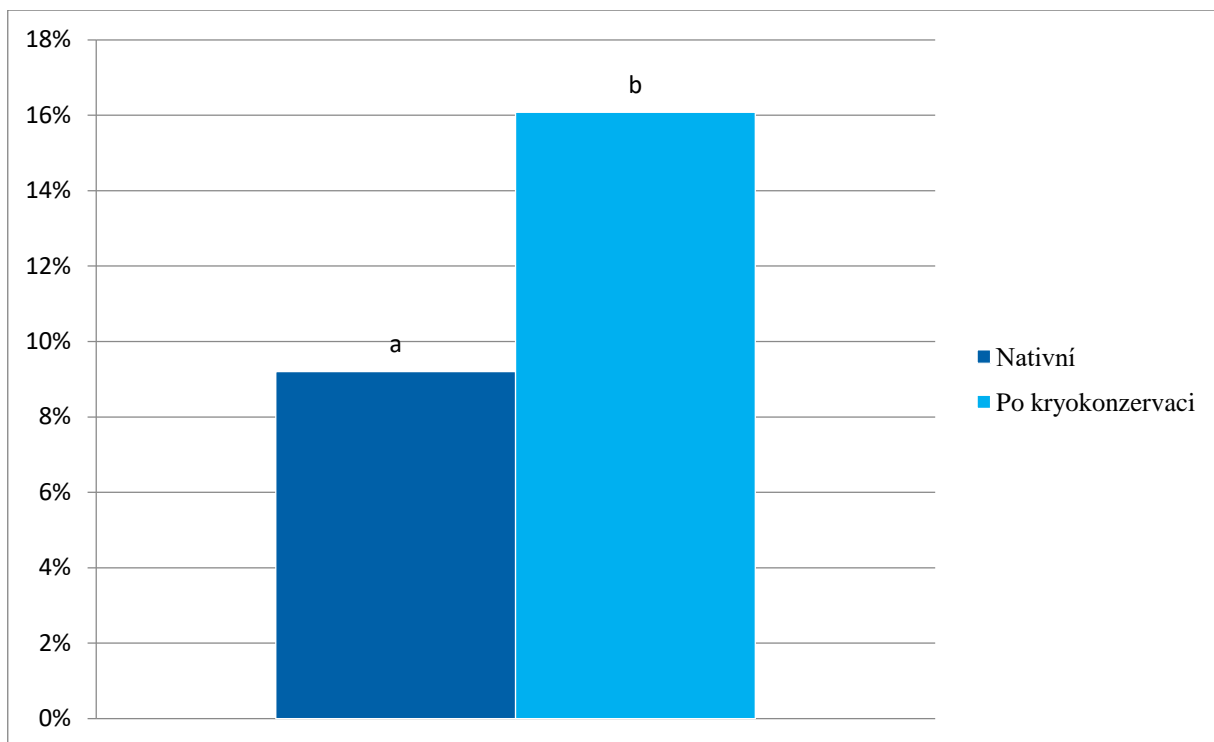
#### 5.2.1 Nativní vs kryokonzervované spermie

Porovnání integrity DNA nativních a kryokonzervovaných spermií znázorňuje graf 2 metodou akridin oranž (AO) a graf 3 metodou toluidinová modř (TB). Rozdíl mezi nativními a kryokonzervovanými spermii byl statisticky průkazný (ANOVA,  $p < 0,001$ ).

Průměrná hodnota pozitivních nativních spermií metodou AO byla 1,375 % a spermií po kryokonzervaci 15,1 %, rozdíl mezi těmito hodnotami byl tedy signifikantní a to 13,725 % (graf 2). Průměrná hodnota pozitivních nativních spermií metodou TB byla 9,2 % a spermií po kryokonzervaci 16,08 %, rozdíl mezi těmito hodnotami byl opět signifikantní a to 6,88 % (graf 3).



**Graf 2:** Rozdíl pozitivních spermií metodou AO před a po kryokonzervaci v %  
<sup>a, b</sup> Hodnoty označené různými indexy v rámci skupiny byly statisticky významně rozdílné (ANOVA,  $p < 0,001$ )



**Graf 3:** Rozdíl pozitivních spermií metodou TB před a po kryokonzervaci v %  
<sup>a, b</sup> Hodnoty označené různými indexy v rámci skupiny byly statisticky významně rozdílné (ANOVA,  $p < 0,001$ )

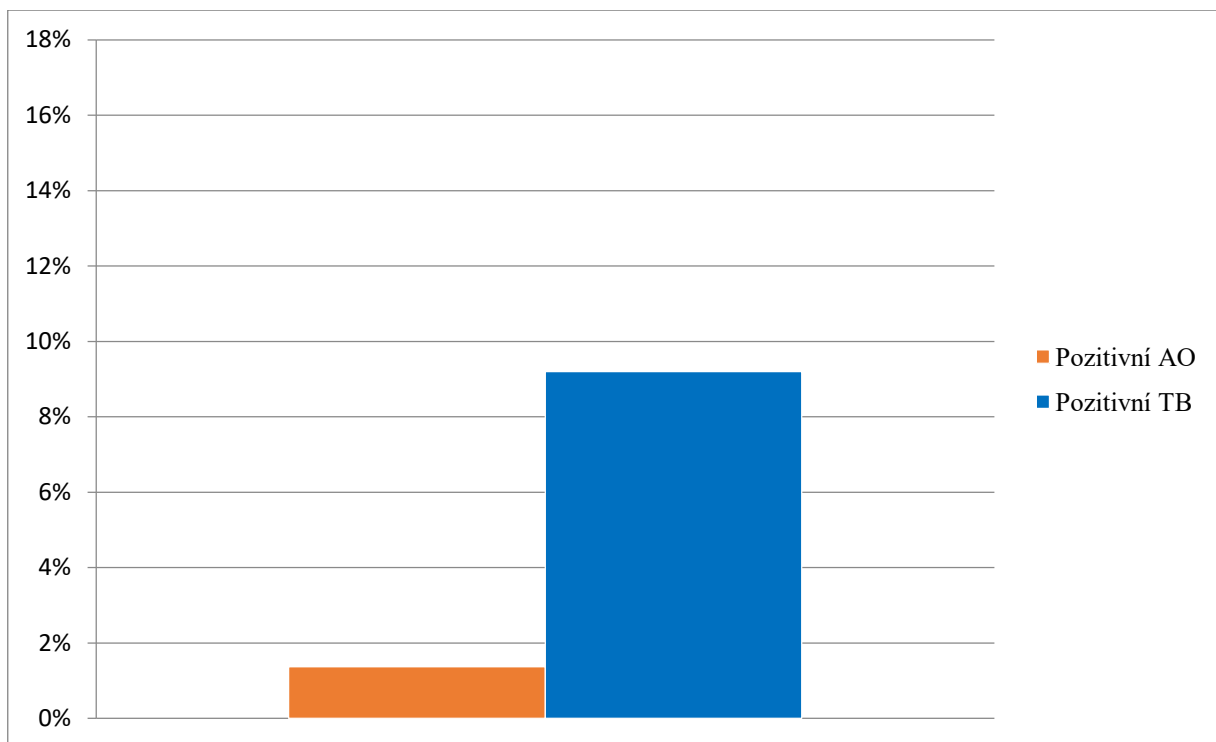
### 5.2.2 Porovnání metod AO vs TB

Porovnání metody AO vs TB znázorňuje graf 4 u nativních spermií a graf 5 u kryokonzervovaných spermií. Statistické vyhodnocení bylo pomocí korelační analýzy. Tato analýza přinesla zajímavé výsledky a to, že tyto metody mají silnou korelační závislost tabulka 1 ( $r > 0$ ).

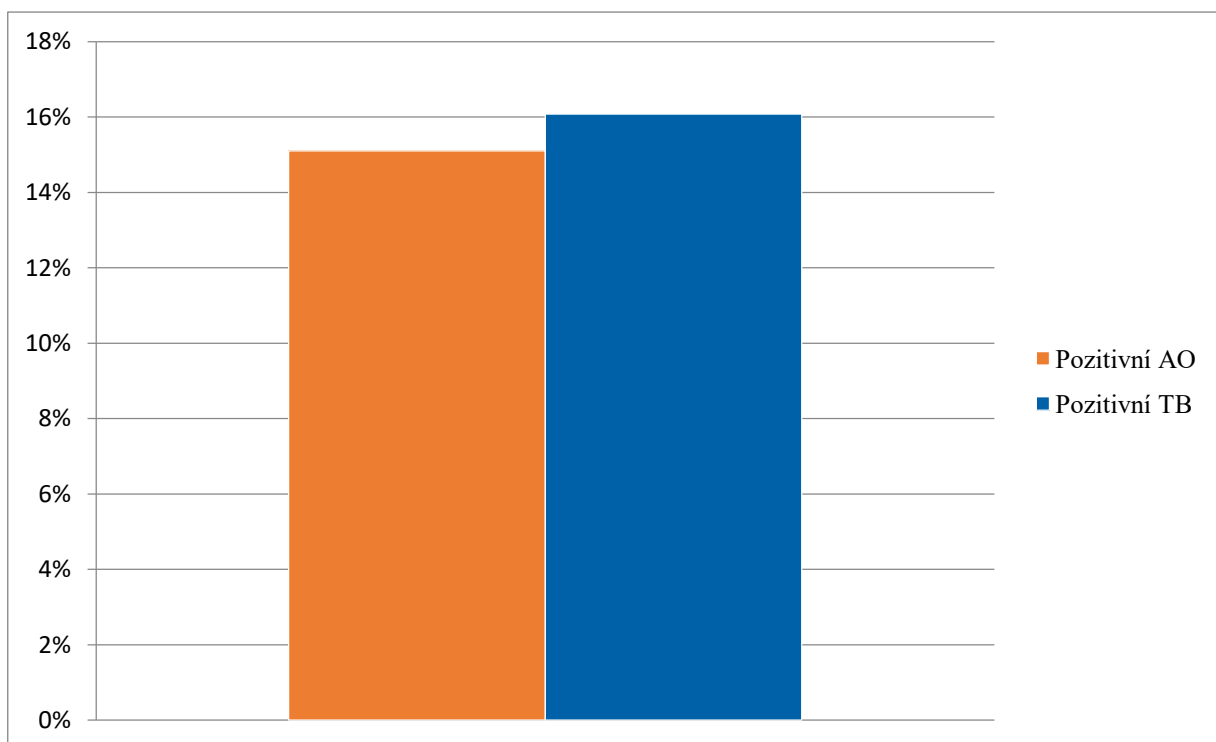
I když podle grafu 4 u nativních spermií je rozdíl mezi metodou AO a TB 7,825 % a u kryokonzervovaných spermií 0,98 % graf 5. Zejména tedy u nativních spermií je rozdíl metod významnější. Minimální hodnota metodou AO byla 5,6 % a metodou TB 7,8 %, naopak maximum bylo metodou AO 24,2 % a metodou TB 23,5 %.

**Tabulka 1:** Pearsonův koeficient korelace metod AO a TB

Pearsonův koeficient korelace (r)	
Metoda	Pozitivní b. TB (%)
Pozitivní b. AO (%)	0.63503



**Graf 4:** Rozdíl metod AO a TB u nativních spermií v %

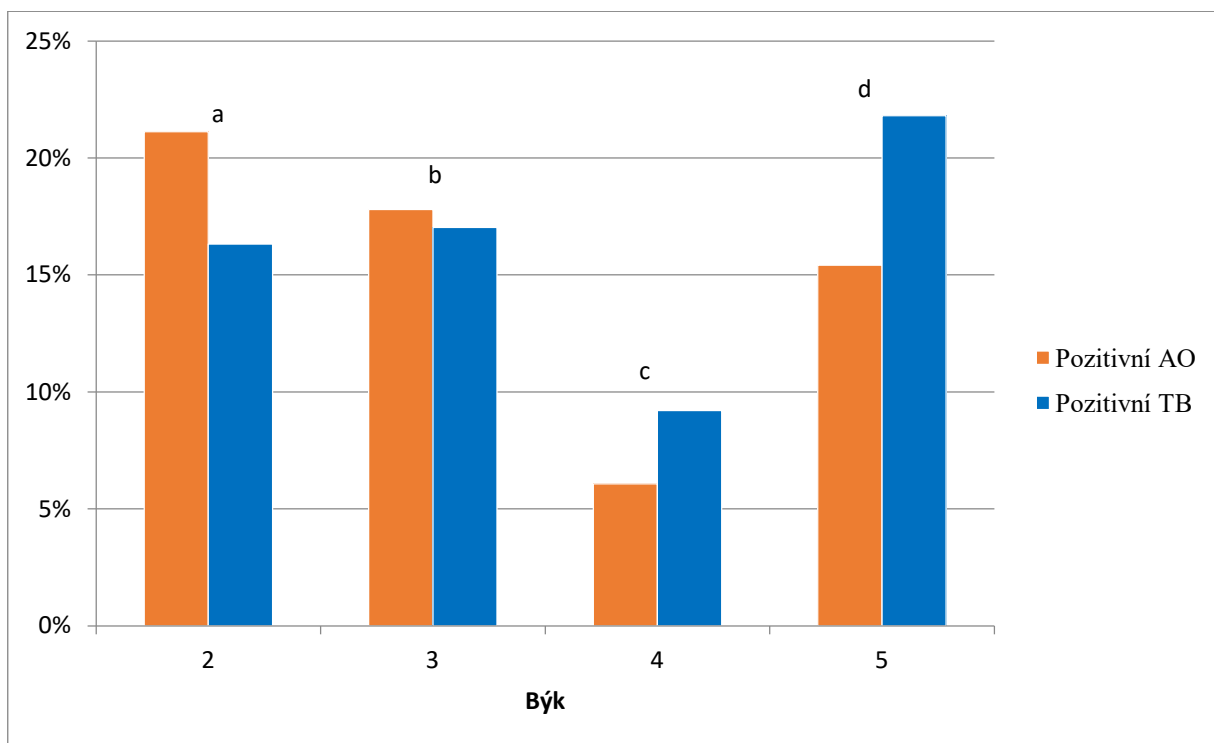


**Graf 5:** Rozdíl metod AO a TB u kryokonzervovaných spermií v %



### 5.2.3 Výsledky analýz integrity DNA a individuální rozdíly býků

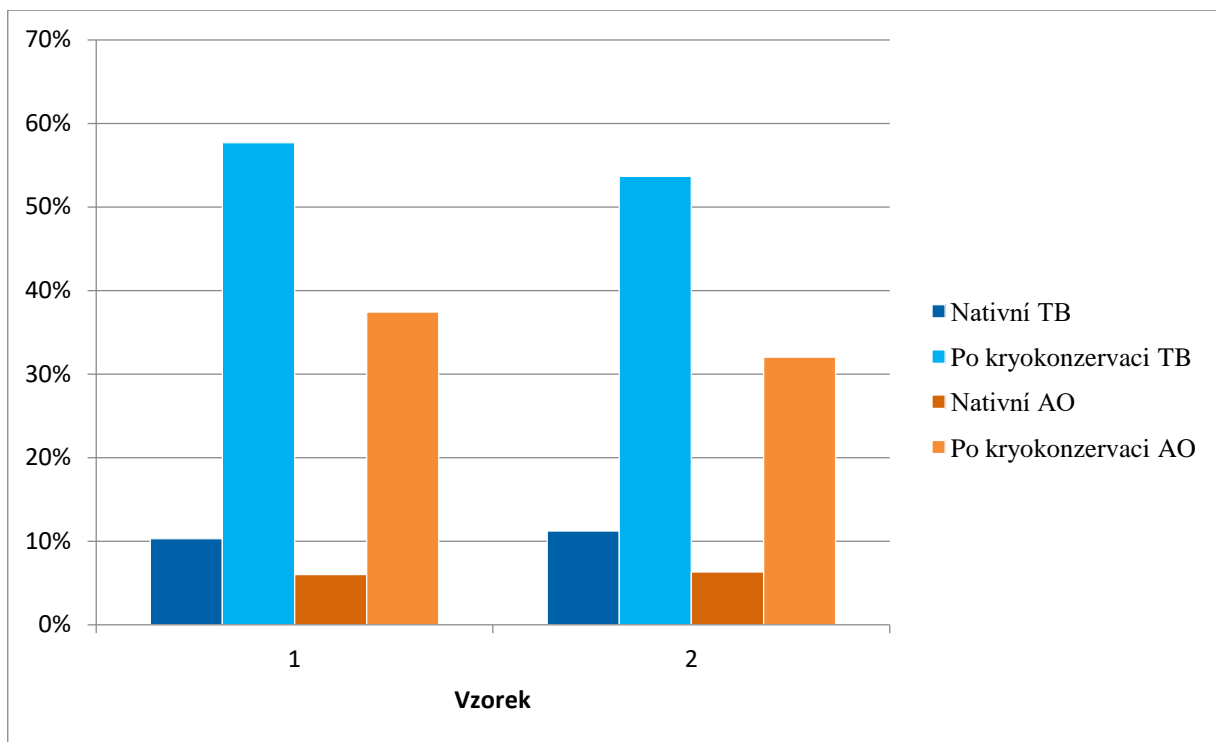
Dále byly porovnány výsledky pozitivních spermií po kryokonzervaci mezi jednotlivými býky, přičemž procento pozitivních spermií metodou AO a TB je znázorněno v grafu 6. Statisticky průkazný rozdíl nebyl mezi býky 2 a 3 (ANOVA,  $p = 0.1661$ ), naopak statisticky průkazný rozdíl byl mezi býky 2, 4 a 5, dále 3, 4 a 5 a mezi býky 4 a 5 (ANOVA,  $p < 0,001$ ). Největší rozdíl byl mezi býky 2 a 4 metodou AO a u býků 4 a 5 metodou TB (ANOVA,  $p < 0,001$ ).



**Graf 6:** Porovnání výsledků pozitivních spermií u jednotlivých býků v %  
a,c,d;b,c,d;c,d Hodnoty označené indexy v rámci skupiny u obou metod byly statisticky významně rozdílné (ANOVA,  $p < 0,001$ )

### 5.2.4 Vyřazený býk

Ke statistickému hodnocení nebyl použit býk z inseminační stanice Natural s.r.o., Hradištko pod Medníkem, jelikož se jednalo o vyřazeného býka, který byl použit pouze pro kontrolu ostatních vzorků. Motilita ejakulátu byla po odběru  $< 80\%$  a koncentrace spermií  $1,45 \times 10^9/\text{ml}$ . Procentuální zastoupení pozitivních buněk nativních spermií a spermií po kryokonzervaci metodou AO a TB ukazuje graf 7. Metodou AO bylo procento pozitivních spermií u nativního ejakulátu v průměru  $6,15\%$  a u kryokonzervovaného ejakulátu  $34,7\%$ . Metodou TB bylo procento pozitivních spermií u nativního ejakulátu v průměru  $10,75\%$  a u kryokonzervovaného ejakulátu  $55,7\%$ . Rozdíl mezi nativním a kryokonzervovaným ejakulátem vyšel tedy u metody AO je  $28,55\%$  a u metody TB  $44,95\%$ .



**Graf 7:** Procentuální zastoupení pozitivních buněk nativních spermíí a spermíí po kryokonzervaci metodou AO a TB

## 6 Diskuze

Poškozená DNA je úzce spojena s mnoha indikátory reprodukčního zdraví, jako je oplození schopnost, kvalita embryí, jejich schopnost implantace, riziko spontánního potratu a vrozených malformací (Agarwal et Allameneni, 2004; Fernández-Gonzalez et al., 2008; Shamsi et al., 2008). Zjišťování a hodnocení integrity DNA má významný potenciál z hlediska stanovování potenciální fertilizační schopnosti spermií (Aitken et De Iuliis, 2010), což potvrzuje studie Bungum et al. (2004), která ukázala, že až 30 % samců v umělé inseminaci má zvášené procento spermií s poškozenou DNA. Dále ve studii Shamsi et al. (2010) bylo pozorováno, že u samic, které prodělaly potrat, mělo 47,7 % spermií samců vysoké poškození DNA. Tito plemenci měli rovněž vysoké hladiny volných radikálů (ROS). Ovšem autoři studií Lewis et al. (2008) a Venkatesh et al. (2009) netvrdí, že existuje spojitost mezi zvýšenou tvorbou ROS a poškozením DNA. Dále studie Greco et al. (2005) ukázala, že poškození DNA je vyšší u ejakulovaných spermií ve srovnání se spermii pocházejících z biopsií varlete. Ve studii Perez-Crepso et al. (2008) bylo dále zjištěno, že zvýšená teplota v nadvarleti nejen snižuje kvalitu základních parametrů spermatu, ale také zvyšuje procento poškození chromatinu. Dále byl prokázán vliv cytoplazmatické kapky (Fortes et al., 2012) a vyššího věku (Rubes et al., 2005). Analýza integrity DNA je velmi objektivním diagnostickým a prognostickým ukazatelem reprodukčního potenciálu spermií (Evenson et Jost, 2000; Spano et al., 2000; Larson-Cook et al., 2003; Saleh et al., 2003) v porovnání s konvenční analýzou spermatu, zahrnující po odběru hodnocení koncentrace spermií, objem, motilitu, případně je doplněna o morfologii či viabilitu (Guzick et al., 1998). Kdy například Guzick et al. (1998) dále uvádějí, že přibližně 15 % neplodných samců mělo konvenční analýzu spermatu v pořádku.

Mimo tyto uvedené vlivy je to rovněž laboratorní zpracovávání spermií, které může ovlivňovat integritu jejich DNA (Donnelly et al., 2001). Několik faktorů, jako je typ použitého kryoprotektantu, rychlost zmrazení a rozmrazování, hladina antioxidantů v ejakulátu a fyzikální vlastnosti spermií mohou ovlivnit integritu DNA spermií. Bylo prokázáno, že velmi rychlé zmrazení způsobuje během kryokonzervace nejmenší poškození DNA (Duty et al., 2002; Revel et al., 2005). Dále Hallap et al. (2004) studovali morfologii spermií a integritu DNA po kryokonzervaci u býků ve věku 11-13 měsíců a následně po 4 letech. Zjistili, že motilita spermií a integrita membrány se zlepšila s věkem. Tomuto tvrzení odporují Singh et al. (2003); Rubes et al. (2005) a Wyrobek et al. (2006), jelikož tvrdí,

že

k většímu procentu poškození DNA dochází s vyšším věkem (nad 6,5 roku).

Jako první parametr byla v experimentální části hodnocena motilita spermií, jelikož patří k významnému ukazateli, který je po rozmrazení standardně v praxi hodnocen, neboť řada poškození spermií se často odráží právě na jejím pohybu (Thun et al., 2002; Gürlér et al., 2016). Motilita byla primárně hodnocena pro kontrolu vzorků tak, aby nebyly v další analýze používány vzorky nesplňující všeobecné standardy. Hodnoceno bylo celkové procento motilních spermií na základě prahové hodnoty VAP (Average Velocity Path - rychlost po průměrné dráze) 15 um/s prostřednictvím počítačem asistované analýzy spermií - CASA (Verstegen et al., 2002). Nejvyšší procento celkové motility po kryokonzervaci vykazoval býk číslo 3 - 49,75 %, naopak nejnižší býk číslo 2 - 34 %. Býci 4 a 5 vykazovali hodnoty podobné a to okolo 36,5 %. Jelikož všechny vzorky byly odebrány a zpracovány stejným způsobem, tak lze předpokládat, že tímto byly do určité míry redukovány vlivy, jako je zpracování, transport, ředidlo či technika zmrazení. Ovšem ukázala se jistá míra individuální variability v rámci jednotlivých plemenů, což je uváděno také ve studii Khalifa et al. (2008). Průměrné hodnoty se dobře shodují s výsledky Nava-Trujillo et al. (2013) a Mahmoud et al. (2014). Dále se shodují s výsledky Celeghini et al. (2008), kteří ovšem použili ředidlo Bioxcell a ejakulát byl získán elektroejakulací. Naopak Tasdemir et al. (2012) použili ředidlo Tris a motilita se po kryokonzervaci pohybovala na hodnotách 27 %. Vyšší procento motilních spermií uvádějí Serafini et al. (2015), a to 48 %, ejakulát byl ovšem získáván elektroejakulací a jako ředidlo bylo použito sojové mléko. Tyto výsledky potvrzují tvrzení, že motilita je pravděpodobně ovlivněna hlavně individualitou plemene než volbou ředidla či kryoprotektantu nebo technikou získání a zpracování (Khalifa et al., 2008).

Experimentální část byla věnována především vlivu kryokonzervace na integritu DNA. Analýzy proběhly pomocí metody založené na principu barvení pomocí toluidinové modři (TB), kde jako pozitivní buňky (s porušenou integritou DNA) byly hodnocené tmavě modré spermie a jako negativní světle modré spermie. A pomocí fluorescenční metody založené na metachromatických vlastnostech akridin oranž (AO), přičemž jako pozitivní buňky (s porušenou integritou DNA) byly hodnocené oranžové a červené spermie, jako negativní spermie zelené.

Průměrná hodnota nativních spermií metodou AO byla 1,375 % a spermií po kryokonzervaci 15,1 %, rozdíl mezi těmito hodnotami byl tedy 13,725 %. Průměrná hodnota nativních spermií metodou TB byla 9,2 % a spermií po kryokonzervaci 16,08 %, rozdíl mezi těmito hodnotami byl tedy 6,88 %. Rozdíl mezi nativními a kryokonzervovanými

spermii byl statisticky průkazný ( $p < 0,001$ ). Naše výsledky se shodují se studií Mukhopadhyay et al. (2010), kteří také porovnávali integritu DNA nativních spermií a spermií po kryokonzervaci, navíc citlivější metodou comet assay, což ukazuje vysokou míru přesnosti a vypovídající hodnoty našich výsledků. Procento pozitivních nativních spermií u plemeníků vyšlo 2,83 % a po kryokonzervaci 10,62 %. Celeghini et al. (2008) také testovali procento pozitivních nativních spermií metodou AO, i když se metodický postup lišil, naše výsledky jsou velmi obdobné. V případě použití ředidla Bioxcell 1,02 % a ředidla Botu-Bov 1,2 %, čímž vyvrátili tvrzení Benson et al. (2012) a Purdy (2006), že typ použitého ředidla má vliv na integritu DNA. Naše výsledky se naopak liší v porovnání s Kumaresan et al. (2017), v jejich experimentu vyšlo metodou AO procento pozitivních spermií po kryokonzervaci pouze 4,65 %. Tento rozdíl mohl být patrně způsoben vlivem použitého ředidla Andromed, dále způsobem kryokonzervace spermií, které probíhalo pomocí poloautomatického zmrazovacího zařízení (Lymberopoulos et Khalifa, 2010). Výsledky se dále liší s Mahmoud et al. (2014), kteří také testovali procento pozitivních spermií před a po kryokonzervaci metodou AO. Procento pozitivních spermií před kryokonzervací vyšlo pouze 0,75 % a po kryokonzervaci 2,5 %. Ovšem studie neuvádí typ ředidla, ani informace o testovaných jedincích. Integritu DNA pomocí barvení toluidinovou modří testovali Nava-Trujillo et al. (2013), jejich výsledky vyšly obdobné jako výsledky naší práce. Dále zjistili, že spermie s poškozenou DNA měly širší hlavičky. Což potvrzuje fakt, že morfologické abnormality mají vliv na integritu DNA (Saacke, 2008). Dále se potvrdil efekt jedince (býka), jelikož individuální variabilita vyšla jak u motility, tak u integrity DNA. Často využívaný test je SCSA (Sperm Chromatin Structure Assay), výsledky tohoto testu jsou v průměru o 5 % nižší v porovnání s našimi výsledky. I když oba metodické přístupy využívají charakteristické vlastnosti AO, odlišnost může být způsobena stylem hodnocení, jelikož metoda SCSA je vyhodnocována pomocí průtokového cytometru (Hu et al., 2009; Fortes et al., 2012; D'Occhio et al., 2013; Korkmaz et al., 2017).

Dále byly v práci porovnány výsledky pozitivních spermií po kryokonzervaci mezi jednotlivými býky (býk 2-5). Statisticky průkazný rozdíl nebyl mezi býky 2 a 3 ( $p = 0.1661$ ), což mohlo být patrně způsobeno např. podobným procentem morfologických abnormalit či konvenčním spermioqramem. Naopak statisticky průkazný rozdíl byl mezi býky 2, 4 a 5, dále 3, 4 a 5 a mezi býky 4 a 5 ( $p < 0,001$ ). Tito býci by se nejspíše mohli lišit procentem morfologických abnormalit, propustností membrány pro ředidlo a kryoprotektivum nebo citlivostí buněk na kryokonzervaci (Hauser et al., 2001; Saacke, 2008; Ensico et al., 2010). Přičemž největší rozdíl byl mezi býky 2 a 4 metodou AO a u býků 4 a 5 metodou TB

( $p < 0,001$ ). Dále lze podle výsledků motility po kryokonzervaci s porovnáním procenty pozitivních spermií u jednotlivých býků zřejmě vyloučit spojitost mezi motilitou a integritou DNA, jelikož nejvyšší procento celkové motility po kryokonzervaci vykazoval býk číslo 3, naopak nejnižší býk číslo 2, což ovšem neodpovídá výsledkům Elbashir et al. (2018). V jejich studii byla prokázána negativní korelace mezi motilitou a integritou DNA. Dále lze vyloučit vliv věku, jelikož Hallap et al. (2005) testovali býky ve věku od 1 roku do 7 let a rozdíl pozitivních spermií metodou AO mezi býkem starým 1 rok a 7 let byl pouze 1,43 %.

Pro kontrolu vzorků byl použit vyřazený býk (býk 1). Tento býk tento býk byl vyřazen na základě nízké motility, která nedosahovala standardních hodnot vstupního hodnocení 70 %. Metodou AO bylo procento pozitivních spermií na integritu DNA u nativního ejakulátu v průměru 6,15 % a u kryokonzervovaného ejakulátu 34,7 %. Metodou TB bylo procento pozitivních spermií u nativního ejakulátu v průměru 10,75 % a u kryokonzervovaného ejakulátu 55,7 %. Rozdíl mezi nativním a kryokonzervovaným ejakulátem u metody AO je 28,55 % a u metody TB 44, 95 %. V porovnání s plemeníky naší studie (býk 2,3,4,5) je procento pozitivních spermií jak nativního tak kryokonzervovaného ejakulátu vyšší. Lze tedy předpokládat, že nižší motilita spermií nativního ejakulátu měla vliv na integritu DNA, což se ukázalo také ve studii Serafini et al. (2016), kde procento pozitivních spermií bylo hodnoceno metodou SCSA, ovšem výsledky jsou obdobné s naší metodou AO, což nasvědčuje ve vzájemnou korelaci těchto metod i možné zástupnosti metodických přístupů. Plemenící jejich studie měli procento pozitivních spermií po kryokonzervaci 8,1 % a vyřazení plemenící 43 %. Studie dále uvádí, že vyřazení jedinci měli vysoké procento abnormalit na hlavičkách, proximální kapky a abnormalit středních částí. Vliv proximální kapky na integritu DNA byl potvrzen (Fortes et al., 2012).

V našem experimentu byla dalším sledovaným parametrem korelace dvou vybraných metod pro testování. Korelační analýza přinesla zajímavé výsledky. Ukázalo se, že tyto metody mají vzájemnou silnou korelační závislost ( $r=0,64$ ). I když u nativních spermií je rozdíl mezi metodou AO a TB 7,825 % a u kryokonzervovaných spermií 0,98 %. Zejména tedy u nativních spermií je rozdíl metod významnější. Ovšem fakt, že tyto dvě metody spolu korelují, je velmi pozitivní. Jelikož se jedná o levné, rychlé metody a velmi dobře dostupné metody z hlediska chemikálií a vybavenosti laboratoře, zejména metoda TB, pro kterou je zapotřebí pouze světelný mikroskop a i samotná toluidinová modř je levnější než akridin oranž. Silnou závislost těchto metod zaznamenali také Ajina et al. (2017) a Erenpreisa et al. (2003), kteří ovšem testovali tyto metody u spermií mužů. Dále korelaci těchto metod

testovali také Kamimura et al. (2010) na ejakulátu kozlů. Zde ovšem došli k závěru, že byla vhodnější metoda TB, jelikož metoda AO neukazovala objektivní výsledky, což je pro praxi velmi pozitivní, jelikož metoda TB nevyžaduje fluorescenční mikroskop na vyhodnocení výsledků a je tedy více dostupná pro andrologické laboratoře.

## 7 Závěr

Práce se zabývala vlivem kryokonzervace na integritu DNA spermií býků a stanovení míry korelace dvou vybraných metod (akridin oranž a toluidinová modř) použitých pro její hodnocení.

Podle výsledků našich pokusů byl prokázán vliv kryokonzervace na integritu DNA spermií býků. Dále výsledky metody založené na principu barvení pomocí toluidinové modři korelovaly s fluorescenční metodou využívající specifické značení poškození DNA akridinovou oranží, jelikož korelační koeficient dvou vybraných metod použitých pro hodnocení prokázal silnou závislost. Hypotézy byly potvrzeny a na základě potvrzených hypotéz byl splněn cíl vyhodnotit vliv kryokonzervace na integritu DNA spermií býků a stanovit míru korelace dvou vybraných metod použitých pro její hodnocení.

Při testování je velmi důležitá optimalizace protokolu v každé laboratoři, používání čerstvých chemikálií, přesné navážky, dodržování a kontrola pH roztoků a dodržování časových sledů. Přičemž v rámci laboratoře KVD byla modifikována a nastavena metodika hodnocení u obou metod a je tedy připravena pro využívání dalšími výzkumnými týmy.

Z naší práce je patrné, že by bylo vhodné zařadit hodnocení integrity DNA do běžného hodnocení býků, jelikož standardně hodnoceny základní parametry ejakulátu nemusí zcela odrážet potenciální fertilizační schopnost. Navíc jak ukázaly naše výsledky lze ji úspěšně hodnotit i pomocí jednoduchého barvení pomocí toluidinové modři a světelného mikroskopu. Naše výsledky poskytly důležité informace jak z hlediska poškození spermií po kryokonzervaci tak pro potencionální rozšiřování metodik do základního hodnocení ejakulátu býků v nativním stavu či po kryokonzervaci.



## 8 Seznam literatury

- Agarwal, A., Allamneni, S. S. R. 2004. The effect of sperm DNA damage in assisted reproduction outcomes. *Mineva Ginecol.* 56. 235-245.
- Agarwal, A., Said, T. M. 2003. Role of sperm chromatin abnormalities and DNA damage in male infertility. *Human Reproduction Update.* 9 (4). 331-345.
- Aitken, R. J., De Iuliis, G. N. 2010. On the possible origins of DNA damage in human spermatozoa. *Molecular Human Reproduction.* 16 (1). 3-13.
- Aitken, R. J., De Iuliis, G. N., McLachlan, R. I. 2009. Biological and clinical significance of DNA damage in the male germ line. *International journal of andrology.* 32. 45-56.
- Aitken, R. J., Koppers, J. A. 2011. Apoptosis and DNA damage in human spermatozoa. *Asian Journal of Andrology.* 13 (1). 36-42.
- Aitken, R. J., Krausz, C. 2001. Oxidative stress, DNA damage and the Y chromosome. *Reproduction.* 122. 497-506.
- Ajina, T., Ammar, O., Haouas, Z., Sallem, A., Ezzi, L., Grissa, I., Sakly, W., Jlali, A., Mehdi, M. 2017. Assessment of human sperm DNA integrity using two cytochemical tests: Acridine orange test and toluidine blue assay. *Andrologia.* 49 (10). 1-6.
- Akhter, S., Ansari, M. S., Rakha, B. A., Andrabi, S. M. H., Kahlid, M., Ullah, N. 2011. Effect of low density lipoproteins in extender on freezability and fertility of buffalo (*Bubalus bubalis*) bull semen. *Theriogenology.* 76. 759-764.
- Alvarez, J. G., Touchstone, J. C., Blasco, L., Storey, B. T. 1987. Spontaneous lipid peroxidation and production of hydrogen peroxide and superoxide in human spermatozoa. Superoxide dismutase as major enzyme protectant against oxygen toxicity. *Journal of Andrology.* 8. 338-348.

- Ames, B. N., Shigenaga, M. K., Hagen, T. M. 1993. Oxidants, antioxidants and the degenerative disease and aging. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. 90. 7915-7922.
- Amirat, L., Tainturier, D., Jeanneau, L., Thorin, Ch., Gérard, O., Courtens, J. L., Anton, M. 2004. Bull semen *in vitro* fertility after cryopreservation using egg yolk LDL: a comparison with Optidyl, a commercial egg yolk extender. Theriogenology. 61. 895-907.
- Andrabi, S. M. 2007. Mammalian sperm chromatin structure and assessment of DNA fragmentation. Journal Assistant Reproduction Genetic. 24. 561-569.
- Andrabi, S. M. H. 2009. Factors affecting the quality of cryopreserved buffalo (*Bubalus bubalis*) bull spermatozoa. Reproduction Domestic Animals. 44. 552-569.
- Andrabi, S. M. H., Siddique, M., Ullah, N., Khan, L. A. 2006. Effect of reducing sperm numbers per insemination dose on fertility of cryopreserved buffalo bull semen. Pakistan Veterinary Journal. 26. 17-19.
- Ansari, M. S., Rakha, B. A., Ullah, N., Andrabi, S. M. H., Iqbal, S., Khalid, M., Akhter, S. 2010. Effect of exogenous glutathione in extender on the freezability of Nili-Ravi buffalo (*Bubalus bubalis*) bull spermatozoa. Animam Science Papers and Reports. 28. 235-244.
- Ansari, M. S., Rakha, B. A., Ullah, N., Andrabi, S. M. H., Khalid, M., Akhter, S. 2011. Effect of L-cysteine in tris-citric egg yolk extender on post-thaw quality of Nili-Ravi buffalo (*Bubalus bubalis*) bull spermatozoa. Pakistan Journal of Zoology. 43. 41-47.
- Bailey, J. L., Bilodeau, J. - F., Cormier, N. 2000. Semen cryopreservation in domestic animals: A damaging and capacitating phenomenon. Journal of Andrology. 21 (1). 1-7.
- Barbas, J. P., Mascarenhas, R. D. 2008. Cryopreservation of domestic animal sperm cells. Cell and Tissue Banking. 10 (1). 49-62.

- Barratt, C. L., Aitken, R. J., Bjorndahl, L., Carrell, D. T., de Boer, P., Kvist, U. 2010. Sperm DNA: organization, protection and vulnerability: from basic science to clinical applications--a position report. *Human Reproduction*. 25. 824-838.
- Barroso, G., Morshedi, M., Oehringer, S. 2000. Analysis of DNA fragmentation, plasma membrane translocation of phosphatidylserine and oxidative stress in human spermatozoa. *Human Reproduction*. 15. 1338-1344.
- Baumber, J., Ball, B. A., Linfor, J. J., Meyers, S. A. 2003. Reactive oxygen species and cryopreservation promote DNA fragmentation in equine spermatozoa. *Journal of Andrology*. 24. 621-628.
- Behrman, S. J., Sawada, Y. 1966. Heterologous and homologous inseminations with human semen frozen and stored in a liquid-nitrogen refrigerator. *Fertility and Sterility*. 17 (4). 457-466.
- Bennetts, L. E., De Iuliis, G. N., Nixon, B., Kime, M., Zelski, K., McVicar, C. M., Lewis, S. E., Aitken, R. J. 2008. Impact of estrogenic compounds on DNA integrity in human spermatozoa: evidence for cross-linking and redox cycling activities. *Mutation Research - Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*. 641. 1-11.
- Benson, J. D., Woods, E. J., Walters, E. M., Critser, J. K. 2012. The cryobiology of spermatozoa. *Theriogenology*. 78 (8). 1682-1699.
- Berruti, G., Paiardi, Ch. 2011. Acrosome biogenesis. *Spermatogenesis*. 1 (2). 95-98.
- Bhosrekar, M. R., Mokashi, S. P., Purohit, J. R., Gokhale, S. B., Mangurkar, B. R. 1994. Effect of glycerolization and deep freezing on the levels and release of enzymes in buffalo semen in relation to initial seminal attributes. In *Proceedings of the 4th World Buffalo Congress*. 3. 465-467.
- Bille, C., Skytthe, A., Vach, W. 2005 Parent's age and the risk of oral clefts. *Epidemiology*. 16. 311-316.

- Boe-Hansen, G. B., Fedder, J., Ersbøll, A. K., Christensen, P. 2006. The sperm chromatin structure assay as a diagnostic tool in the human fertility clinic. *Human Reproduction*. 21 (6). 1576-1582.
- Boissonneault, G. 2002. Chromatin remodeling during spermiogenesis: a possible role for the transition proteins in DNA strand break repair. *FEBS Lett*. 514. 111-114.
- Borini, A., Tarozzi, N., Bizzaro, D., Bonu, M. A., Fava, L., Flamigni, C., Coticchio, G. 2006. Sperm DNA fragmentation: paternal effect on early post-implantation embryo development in ART. *Human Reproduction*. 21. 2876-2881.
- Brener, E., Rubinstein, S., Cohen, G., Shternall, K., Rivlin, J., Breitbart, H. 2003. Remodeling of the actin cytoskeleton during mammalian sperm capacitation and acrosome reaction. *Biology of Reproduction*. 68. 837-845.
- Brewer, L., Cortez, M., Balhorn, R. 2002. Condensation of DNA by spermatid basic nuclear proteins. *Journal Biology Chemical*. 277. 28895-38900.
- Bucak, M. N., Tuncer, P. B., Sarıözkan, S., Başpınar, N., Taşpınar, M., Çoyan, K., Bilgili, A., Peker-Akalin, P., Büyükleblebici, S., Aydos, S., Ilgaz, S., Sunguroğlu, S., Öztuna, D. 2010. Effects of antioxidants on post-thawed bovine sperm and oxidative stress parameters: Antioxidants protect DNA integrity against cryodamage. *Cryobiology*. 61. 248-253.
- Bungum, M., Humaidan, P., Spano, M., Jepson, K., Bungum, L., Giwercman, A. 2004. The predictive value of sperm chromatin structure assay (SCSA) parameters for the outcome of intrauterine insemination, IVF and ICSI. *Human Reproduction*. 19. 1401-1408.
- Büyükleblebici, S., Tuncer, P. B., Bucak, M. N., Eken, A., Sarıözkan, S., Taşdemir, U., Endirlik, B. Ü. 2014. Cryopreservation of bull sperm: Effects of extender supplemented with different cryoprotectants and antioxidants on sperm motility, antioxidant capacity and fertility results. *Animal Reproduction Science*. 150 (3-4). 77-83.

- Calogero, A. E., Palma, A., Grazioso, C., Barone, N., Romeno R., Rappazzo G., D'Agata, R. 2001. Aneuploidy rate in spermatozoa of selected men with abnormal semen parameters. *Human Reproduction*. 16. 1172-1179.
- Camatini, M. 1989. The cytoskeleton of mammalian sperm heads. *Journal of muscle research and cell motility*. 10 (2). 169.
- Cebesoy, F. B., Aydos, K., Unlu, C. 2006. Effect of sperm chromatin damage on fertilization ratio and embryo quality post-ICSI. *Arch. Andrology*. 52. 397-402.
- Celeghini, E. C. C., de Arruda, P. R., de Andrade, C. A. F., Nascimento, J., Raphael, C. F., Rodrigues, P. H. M. 2008. Effect that bovine sperm cryopreservation using two different extenders has on sperm membranes and chromatin. *Animal Reproduction Science*. 104. 119-131.
- Celik-Ozenci, C., Jakab, A., Kovacs, T., Catalanotti J., Demir R., Bray-Ward, P., Ward D., Huszar, G. 2004. Sperm selection for ICSI: shape properties do not predict the absence or presence of numerice chromosomal aberrations. *Human Reproduction*. 19. 2052-2059.
- Ciani, F., Cocchia, N., Esposito, L., Avallone, L. 2012. Fertility cryopreservation. *Advances in Embryo Transfer*. 60. 225-248.
- Clark, J. M., Eddy, E. 1975. Fine structural observations on the origin and associations of primordial germ cells of the mouse. *Develop Biology*. 47. 136-155.
- Cockett, A. T., Takihara, H., Cosentino, M. J. 1984. The varicocele. *Fertility and Sterility*. 41. 5-11.
- Cornwall, G. A. 2014. Role of posttranslational protein modifications in epididymal sperm maturation and extracellular quality control. *Adv Exp Med Biol*. 759. 159-80.
- D'Occhio, M. J., Hengstberger, K. J., Tutt, D., Holroyd, R. G., Fordyce, G., Boe-Hansen, G. B., Johnston, S. D. 2013. Sperm chromatin in beef bulls in tropical environments. *Theriogenology*. 79 (6). 946-952.

- Dadoune, J. P. 2003. Expression of mammalian spermatozoal nucleoproteins. *Microscopy Research and Technique*. 61. 56-75.
- De Iuliis, G. N., Wingate, J. K., Koppers, A. J., McLaughlin, E. A., Aitken, R. J. 2006. Definitive evidence for the nonmitochondrial production of superoxide anion by human spermatozoa. *Journal of Clinical Endocrinol Metabolism*. 91. 1968-1975.
- De Jonge, Ch. J., Barratt, Ch. 2006. *The sperm cell: Production, Maturation, Fertilization, Regeneration*. Cambridge University Press. UK. p. 372. ISBN: 978-0521853972.
- De Lamirande, E., Jiang, H., Zini, A., Kodama, H., Gagnon, C. 1997. Reactive oxygen species and sperm physiology. *Review Reproduction*. 2. 48-54.
- Di Santo, M., Tarozzi, N., Nadalini, M., Borini, A. 2012. Human SpermCryopreservation: Update on Techniques, Effect on DNA Integrity, and Implications for ART. *Advances in Urology*. 12.
- Donnelly, E. T., McClure, N., Lewis, S. E. 2001. Cryopreservation of human semen and prepared sperm: effects on motility parameters and DNA integrity. *Fertility and Sterility*. 76 (5). 892-900.
- Duty, S. M., Singh, N. P., Ryan, L., Chen, Z., Lewis, C., Hunag, T. 2002. Reliability of the comet assay in cryopreserved human sperm. *Human Reproduction*. 17 (5). 1274-1280.
- Duru, N. K., Morshedi, M., Oehninger, S. 2000. Effects of hydrogen peroxide on DNA and plasma membrane integrity of human spermatozoa. *Fertility and Sterility*. 74. 1200-1207.
- Dvorakova, K., Moore, H. D. M., Sebkova, N., Palecek, J. 2005. Cytoskeleton localization in the sperm head prior to fertilization. *Reproduction*. 130 (1). 61-69.
- Eddy, E. M. 2006. The spermatozoon In *Physiology of Reproduction*. Elsevier Academic. 1-54.

- Eddy, E. M., Toshimori, K., O'Brien, D. A. 2003. Fibrous sheath of mammalian spermatozoa. *Microscopy Research and Technique*. 61. 103-115.
- Elbashir, S., Magdi, Y., Rashed, A., Ibrahim, M. A., Edris, Y., Abdelaziz, A. M. 2018. Relationship between sperm progressive motility and DNA integrity in fertile and infertile men. *Middle East Fertility Society Journal*. 12 (2). 1-4.
- Ellis, D. J., Shadan, S., James, P. S., Henderson, R. M., Edwardson, J. M., Hutchings, A., Jones, R. 2002. Post-testicular development of a novel membrane substructure within the equatorial segment of ram, bull, boar, and goat spermatozoa as viewed by atomic force microscopy. *Journal of Structural Biology*. 138. 187-198.
- Enciso, M., Cisale, H., Johnston, S. D., Sarasa, J., Fernández, J. L., Gosálvez, J. 2010. Major morphological sperm abnormalities in the bull are related to sperm DNA damage. *Science Direct*. 76 (2011). 23-32.
- Erenpreisa, J., Erenpreiss, J., Freivalds, T., Slaidina, M., Krampe, R., Butikova, J., Ivanov, A., Pjanova, D. 2003. Toluidine blue test for sperm DNA integrity and elaboration of image cytometry algorithm. *Cytometry part A*. 52 (1). 19-27.
- Erenpreisa, E. A., Sondore, O., Zirne, R. A. 1988. Conformational changes in the chromatin of tumor cells and the phenomenon of nuclear achromasia. *Eksp Onkology*. 10 (2). 54-57.
- Erenpreiss, J., Spano, M., Erenpreisa, J., Bungum, M., Giwercman, A. 2006. Sperm chromatin structure and male fertility: Biological and clinical aspects. *Asian Journal of Andrology*. 8 (1). 11-29.
- Evenson, D. P. 2016. The sperm chromatin structure assay (SCSA) and another sperm DNA fragmentation tests for evaluation of sperm nuclear DNA integrity as related fertility. *Animal Reproduction Science*. 169. 56-75.
- Evenson, D. P., Jost, L. K. 2000. Sperm chromatin structure assay is useful for fertility assessment. *Meth Cell Science*. 22. 169-189.

Evenson, D. P., Larson, K. L., Jost, L. K. 2002. Sperm chromatin structure assay: Its clinical use for detecting sperm DNA fragmentation in male infertility and comparisons with other techniques. *Journal of Andrology*. 23 (1). 25-43.

Evenson, D. P., Wixon, R. 2006. Clinical aspects of sperm DNA fragmentation detection and male infertility. *Theriogenology*. 65. 979-991.

Fabbri, R., Ciotti, P. M., Di Tommaso, B., Magrini, O., Notarangelo, L., Porcu, E., Contro, E., Venturoli, S. 2004. Tecniche di crioconservazione riproduttiva. *Rivista Italiana di Ostetricia e Ginecologia*. 3. 33-41.

Farrell, P. B., Presicce, G. A., Brockett, C. C., Foote, R. H. 1998. Quantification of bull sperm characteristics measured by computer-assisted sperm analysis (CASA) and the relationship to fertility. *Theriogenology*. 49. 871-879.

Fernández-Gonzalez, R., Moreira, P. N., Pérez-Crespo, M., Sánchez-Martín, M., Ramirez, M. A., Pericuesta, E. 2008. Long term effects of mouse intracytoplasmic sperm injection with DNA fragmented sperm on health and behavior of adult offspring. *Biological Reproduction*. 78 (4). 761-772.

Finch, J. T., Klug, A. 1976. Solenoidal model superstructure in chromatin. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 73. 1897-1901.

Fortes, M. R. S., Holroyd, R. G., Reverter, A., Venus, B. K., Satake, N., Boe-Hansen, G. B. 2012. The integrity of sperm chromatin in young tropical composite bulls. *Theriogenology*. 78 (2). 326-333.

Fraga, C. G., Motchnik, P. A., Wyrobek, A. J., Rempel, D. M., Ames, B. N. 1996. Smoking and low antioxidant levels increase oxidative damage to sperm DNA. *Mutation Research-Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*. 351 (2). 199-203.

Fuentes-Mascorro, G., Serrano, H., Rosado, A. 2000. Sperm chromatin. *Arch. Androlgical*. 45. 215-225.



- Gamčík, P., Kozumplík, J. 1984. *Andrológia a umelá inseminácia hospodárskych zvierat*. Priroda Bratislava. Praha. 299 s. ISBN: 80-07-00540-4.
- Garner, D. L., Hafez, E. S. E. 2000. Spermatozoa and seminal plasma. In *Reproduction in Farm Animals*. 96-109.
- Giwerzman, A., Richthoff, J., Hjøllund, H., Bonde, J. P., Jepson, K., Frohm, B., Spano, M. 2003. Correlation between sperm motility and sperm chromatin structure assay parameters. *Fertility and Sterility*. 80 (6). 1404-1412.
- Gorczyca, W., Gong, J., Darzynkiewicz, Z. 1993. Detection of DNA strand breaks in individual apoptotic cells by the in situ terminal deoxynucleotidyl transferase and nick translation assay. *Cancer Research*. 53 (8). 1945-1951.
- Gosálvez, J., López-Fernández, C., Fernández, J. L., Gouraud, A., Holt, W. V. 2011. Relationships between the dynamics of iatrogenic DNA damage and genomic design in mammalian spermatozoa from eleven species. *Molecular Reproduction and Development*. 78. 951-961.
- Greco, E., Romano, S., Iacobelli, M., Ferrero, S., Baroni, E., Minasi, M. G. 2005. ICSI in cases of sperm DNA damage: beneficial effect of oral antioxidant treatment. *Human Reproduction*. 20. 2590-2594.
- Grootegoed, J. A., Siep, M., Baarends, W. M. 2000. Molecular and cellular mechanisms in spermatogenesis. *Best Practice and Research Clinical Endocrinology and Metabolism*. 14. 331-343.
- Guraya, S. S. 1995. The comparative cell biology of accessory somatic (or Sertoli) cells in the animal testis. *International Review of Cytology*. 160. 163-220.
- Gürler, H., Malama, E., Heppelmann, M., Calisici, O., Leiding, C., Kastelic, J. P., Bollwein, H. 2016. Effect of cryopreservation on sperm viability, synthesis of reactive oxygen species, and DNA damage of bovine sperm. *Theriogenology*. 86 (2). 562-671.

Guzick, D. S., Overstreet, J. W., Factor-Litvak, P., Brazil, C. K., Nakajima, S. T., Coutifaris, C., Carson, S. A., Cisneros, P., Steinkampf, M. P., Hill, J. A., Xu, D., Vogel, D. L. 2001. Sperm morphology, motility, and concentration in fertile and infertile men. *New England Journal of Medicine*. 345 (19). 1388-1393.

Guzick, D. S., Sullivan, M. W., Adamson, G. D., Cedars, M. I., Falk, R. J., Peterson, E. P. 1998. Efficacy of treatment for unexplained infertility. *Fertility and Sterility*. 70 (2). 207-213.  
Hafez, B., Hafez, E. S. E. 2000. *Reproduction in farm animals*. Co-directors. USA. p. 510. ISBN: 0-683-30577-8.

Hallap, T., Haard, M., Jaakma, U., Larsson, B., Rodriguez-Martinez, H. 2004. Variations in quality of frozen-thawed semen from Swedish and white AI sires at 1 and 4 years of age. *International Journal of Andrology*. 27. 166-171.

Hallap, T., Nagya, S., Haarde, M., Jaakmac, U., Johannisson, A., Rodriguez-Martinez, H. 2005. Sperm chromatin stability in frozen-thawed semen is maintained over age in AI bulls. *Theriogenology*. 63 (3). 1752-1763.

Hammerstedt, R. H., Graham, J. K., Nolan, J. P. 1990. Cryopreservation of mammalian sperm: what we ask them to survive. *Journal of Andrology*. 11. 73-88.

Haraguchi, C. M., Mabuchi, T., Hirata, S., Shoda, T., Hoshi, K., Akasaki, K., Sadaki, Y. 2005. Chromatoid bodies: agresome-like characteristics and degradation sites for organelles of spermiogenic cells. *Journal Histochemical Cytochemical*. 53. 455-465.

Hauser, R., Paz, G., Botchan, A., Yogev, L., Yavetz, H. 2001. Varicocele: effect on sperm functions. *Human Reproduction Update*. 7. 482-485.

Hazzouri, M., Rousseaux, S., Mongelard, F., Usson, Y., Pelletier, R., Faure, A. K., Vourc'h, C., Sele, B. 2000. Genome organization in the human sperm nucleus studied by FISH and confocal microscopy. *Molecular Reproduction and Development*. 55. 307-315.

Hirohashi, N. 2016. Site of mammalian sperm acrosome reaction. *Sperm acrosome biogenesis and fiction during fertilization*. 220. 145-158.

- Holt, W. V. 1997. Alternative strategies for the long-term preservation of spermatozoa. *Reproduction, Fertility and Development*. 9 (3). 309-319.
- Holt, W. V. 2000. Basic aspects of frozen storage of semen. *Animal Reproduction Science*. 62 (1-3). 3-22.
- Holt, W. V. 2000. Fundamental aspects of sperm cryobiology: the importance of species and individual differences. *Theriogenology*. 53. 47-58.
- Holt, W. V., Palomo, M. J. 1996. Optimization of a continuous real-time computerized semen analysis system for ram sperm motility assessment and evaluation of four methods of semen preparation. *Reproduction Fertility and Development*. 8. 219-230.
- Holt, W. V., Penfold, L. M. 2014. Fundamental and practical aspects of semen cryopreservation. *Animal Andrology: Theories and Applications*. 76. 76-99.
- Hu, J. H., Li, Q. W., Zan, L. S., Jiang, Z. L., An, J. H., Wang, L. Q., Jia, Y. H. 2009. The cryoprotective effect of low-density lipoproteins in extenders on bull spermatozoa following freezing–thawing. *Animal Reproduction Science*. 117 (1-2). 11-17.
- Huszar, G., Sbracia, M., Vigue, L., Miller, D. J., Shur, B. D. 1997. Sperm plasma membrane remodeling during spermiogenic maturation in men: relationship among plasma membrane beat 1,4 galactosyltransferase, cytoplasmic creatine phosphokinase and creatine phosphokinase isoform ratios. *Biology Reproduction*. 56. 1020-1024.
- Champe, P. C., Harvey, R. A., Ferrier, D. R. 2005. DNA structure and replication. In: *Lippincott's Illustrated Reviews: Biochemistry*. Lippincott Williams & Wilkins. 393-412.
- Chenoweth, P. J., Lorton, S. P. 2014. *Animal andrology. Theories and applications*. CABI. UK. USA. p. 568. ISBN: 978-1-78064-316-8.
- Inaba K. 2003. Molecular architecture of the sperm flagella: molecules for motility and signaling. *Zoological Science*. 20. 1043-1056.

- Irvine, D. S., Twigg, J. P., Gordon, E. L., Fulton, N., Milne, P. A., Aitken, R. J. 2000. DNA integrity in human spermatozoa: relationships with semen quality. *Journal of Andrology*. 21. 33-44.
- Ishijima, S., Baba, S. A., Mohri, H., Suarez, S. S. 2002. Quantitative analysis of flagellar movement in hyperactivated and acrosome-reacted golden hamster spermatozoa. *Molecular Reproduction Development*. 61 (3). 376-84.
- Jelínek, P., Koudela, K., Doskočil, J., Illek, J., Kotrbáček, V., Kovářů, F., Kroupová, V., Kučera, M., Kudláč, E., Trávníček, J., Valent, M. 2003. *Fyziologie hospodářských zvířat*. Mendelova zemědělská a lesnická univerzita. Brno. 414 s. ISBN: 80-7157-644-1.
- Johnson, G. D., Lalancette, C., Linnemann, A. K., Leduc, F., Boissonneault, G., Krawetz, S. A. 2011. The sperm nucleus: chromatin, RNA, and the nuclear matrix. *Reproduction*. 141. 21–36.
- Justice, T., Christensen, G. 2013. Sperm cryopreservation methods. In: Carrell, D. T., Aston, K. I. *Spermatogenesis: Methods and Protocols*. Springer Science and Business Media. 209-215.
- Kadirvel, G., Kumas, S., Kumaresan, A., Kathiravan, P. 2009. Capacitation status of fresh and frozen-thawed buffalo spermatozoa in relation to cholesterol level, membrane fluidity and intracellular calcium. *Animal Reproduction Science*. 116 (3-4). 244-253.
- Kamimura, C. F., Jacomini, J. O., Beletti, M. E. 2010. Chromatin alterations in ram and goat spermatozoa evaluated by toluidine blue and acridine orange. *Ciência e Agrotecnologia*. 34 (1). 212-219.
- Kaneko, T., Whittingham, D. G., Overstreet, J. W., Yanagimachi, R. 2003. Tolerance of the mouse sperm nuclei to freeze-drying depends on their disulfide status. *Biological Reproduction*. 69. 1859-1862.

- Kashino, G., Liu, Y., Suzuki, M., Masunaga, S., Kinashi, Y., Ono, K., Tano, K., Watanabe, M. 2010. An alternative mechanism for radioprotection by dimethyl sulfoxide; possible facilitation of DNA double-strand break repair. *Journal of Radiation Research*. 51. 733-740.
- Kazemie, M., Oko, R. 1996. The identification of nuclear and acrosomal membrane proteins interacting with the sperm head cytoskeleton. *Molecular biology of the cell*. 7. 2256.
- Kelly, T. L. J., Transler, J. M. 2004. Reproductive epigenetics. *Clinical Genetic*. 65. 247-260.
- Khalifa, T. A., Rekkas, C. A., Lymberopoulos, A. G., Sioga, A., Dimitriadis, I., Papanikolaou, T. 2008. Factors affecting chromatin stability of bovine spermatozoa. *Animal Reproduction Science*. 104 (2-4). 143-163.
- Kierszenbaum, A. L. 2002. Intramanchette transport (IMT): managing the making of the spermatid head, centrosome, and tail. *Molecular Reproduction Development*. 63. 1-4.
- Kopeika, J., Thornhill, A., Khalaf, Y. 2014. The effect of cryopreservation on the genome of gametes and embryos: principles of cryobiology and critical appraisal of the evidence. *Human Reproduction Update*. 21 (2). 209-227.
- Korkmaz, F., Malama, E., Siuda, M., Leiding, C., Bollwein, H. 2017. Effects of sodium pyruvate on viability, synthesis of reactive oxygen species, lipid peroxidation and DNA integrity of cryopreserved bovine sperm. *Animal reproduction Science*. 185. 18-27.
- Kubo-Irie, M., Matsumiya, K., Iwamoto T., Kaneko S. 2005. Morphological abnormalities in the spermatozoa of fertile and infertile men. *Molecular Reproduction Development*. 70. 70-81.
- Kültz, D., Chakravarty, D. 2001. Maintenance of genomic integrity in mammalian kidney cells exposed to hyperosmotic stress. *Comparative Biochemistry and Physiology*. 130. 421-428.
- Kumaresan, A., Johannisson, A., Al-Essawe, E. M., Morrell, J. M. 2017. Sperm viability, reactive oxygen species, and DNA fragmentation index combined can discriminate between above- and below-average fertility bulls. *Journal of dairy science*. 100 (7). 5824-5836.

- Kunkitti, P., Bergqvist, A. S., Sjunnesson, Y., Axner, E. 2015. The ability of feline spermatozoa in different epididymal regions to undergo capacitation and acrosome reaction. *Animal Reproduction Science*. 1-11.
- Kuster, C. E., Hess, R. A., Althouse, G. C. 2004. Immunofluorescence reveals ubiquitination of retained distal cytoplasmic droplets on ejaculated porcine spermatozoa. *Journal of Andrological*. 25. 340-347.
- Larson-Cook, K. L., Brannian, J. D., Hansen, K. A., Kasperson, K. M., Aamold, E. T., Evenson, D. P. 2003. Relationship between the outcomes of assisted reproductive techniques and sperm DNA fragmentation as measured by the sperm chromatin structure assay. *Fertility and Sterility*. 80. 895-902.
- Layek, S. S., Mohanty, T. K., Kumaresan, A., Parks, J. E. 2016. Cryopreservation of bull semen: Evolution from egg yolk based to soybean based extenders. *Animal Reproduction Science*. 172. 1-9.
- Lee, J., Richburg, J. H., Younkin, S. C., Boekelheide, K. 1997. The Fas system is a key regulator of germ cell apoptosis in the testis. *Endocrinology*. 138. 2081-2088.
- Lewis, S. E., Agbaje, I., Alvarez, J. 2008. Sperm DNA tests as useful adjuncts to semen analysis. *Systems Biology in Reproductive Medicine*. 54 (3). 111-125.
- Li, Z., Lin, Q., Liu, R., Xie, W., Xiao, W. 2007. Reducing oxidative DNA damage by adding antioxidants in human semen samples undergoing cryopreservation procedure. *Zhonghua Yi Xue Za Zhi*. 87. 3174-3177.
- Liang, H. W., Qiu, S. F., Shen, J., Sun, L. N., Wang, J. Y., Bruce, I. C., Xia, Q. 2008. Genistein attenuates oxidative stress and neuronal damage following transient global cerebral ischemia in rat hippocampus. *Neuroscience Letters*. 438. 116-120.
- Lin, Ch., Tsai, S. 2012. The effect of cryopreservation on DNA damage, gene expression and protein abundance in vertebrate. *Italian Journal of Science*. 11 (1). 1-5.

Lewis, S. 2003. Effects of cryopreservation on testicular sperm nuclear DNA fragmentation and its relationship with assisted conception outcome following ICSI with testicular spermatozoa. *Reproductive BioMedicine*. 7 (4). 449-455.

Louda, F., Vaněk, D., Ježková, A., Stádník, L., Bjelka, M., Bezdíček, J., Pozdíšek, J. 2008. Uplatnění biologických zásad při řízení reprodukce plemenic. Výzkumný ústav pro chov skotu, s.r.o. Rapotín. 56 s. ISBN: 978-80-87144-05-3.

Lüllmann-Rauch, R. 2012. *Histologie*. Grada Publishing a.s. Praha. 556 s. ISBN: 9788024737294.

Lymberopoulos, A. G., Khalifa, T. A. A. 2010. Sperm chromatin stability during In Vitro manipulation of beef bull semen. *Reproduction in Domestic Animals*. 45 (2). 307-314.

Mahadevan, M., Trounson, A. O. 1984. Effect of cooling, freezing and thawing rates and storage conditions on preservativ of human spermatozoa. *Andrologia*. 16 (1). 52-60.

Mahmoud, K. Gh. M., El-Sokary, A. A. E., Abdel-Ghaffar, A. E., Abou El-Roos, M. E. A., Ahmed, Y. F. 2014. Analysis of chromatin integrity and DNA damage of buffalo spermatozoa. 16 (2). 161-166.

Manicardi, G. C., Tombacco, A., Bizzaro, D., Bianchi, U., Bianchi, P., Sakkas, D. 1998. DNA strand breaks in ejaculated human spermatozoa: comparison of susceptibility to the nick translation and terminal transferase assays. *Histochemical Journal*. 30. 33-39.

Marcon, L., Boissonneault, G. 2004. Transient DNA strand breaks during mouse and human spermiogenesis new insights in stage specificity and link to chromatin remodeling. *Biology Reproduction*. 70. 910-918.

Martin, G., Sabido, O., Durand, P., Levy, R. 2004. Cryopreservation induces an apoptosis-like mechanism in bull sperm. *Biology of Reproduction*. 71. 28-37.

- Mazzilli, F., Rossi, T., Sabatini, L., Pulcinelli, F. M., Rapone, S., Dondero, F., Gazzaniga, P. P. 1995. Human sperm cryopreservation and reactive oxygen species (ROS) production. *Acta Europaea Fertilitatis*. 26. 145-148.
- McCarthy, M. J., Baumber, J., Kass, P. H., Meyers, S. A. 2010. Osmotic stress induces oxidative cell damage to rhesus macaque spermatozoa. *Biology of Reproduction*. 82. 644-651.
- McLay, D. W., Hugh, J. 2003. Clarke remodelling the paternal chromatin at fertilization in mammals. *Reproduction*. 125. 625-633.
- Medeiros, C. M. O., Forell, F., Oliveira, A. T. D., Rodrigues, J. L. 2002. Current status of sperm cryopreservation: Why isn't it better?. *Theriogenology*. 57. 327-344.
- Meistrich, M. L., Mohapatra, B., Shirley, C. R., Zhao, M. 2003. Roles of transition nuclear proteins in spermiogenesis. *Chromosomal*. 111. 483-488.
- Memon, M. A., Micklesen, D. W., Goyal, H. O. 2007. Examination of the reproductive tract and evaluation of potential breeding soundness in the buck. In *Current Therapy in Large Animal Theriogenology*. 13 (2). 515-518.
- Miki K., Willis W. D., Brown P. R., Goulding E. H., Gulcher K. D., Eddy E. M. 2002. Targeted disruption of the *Akap4* gene causes defects in sperm flagellum and motility. *Developmental Biology*. 248. 331-341.
- Miller, D., Brinkwort, M., Iles, D. 2010. Paternal DNA packaging in spermatozoa: more than the sum of its parts? DNA, histones, protamines and epigenetics. *Reproduction*. 139. 287-301.
- Moore, H. D. M. 2001. Molecular biology of fertilization. *Journal of Reproduction and Fertility*. 57. 105-110.
- Morris, I. D., Ilott, S., Dixon, L., Brison, D. R. 2002. The spektrum of DNA damage in human sperm assessed by single cell gel electrophoresis (Comet assay) and its relationship to fertilization and embryo development. *Human Reproduction*. 17 (4). 990-998.



- Mukhopadhyay, C. S., Gupta, A. K., Yadav, B. R., Chauhan, I. S., Gupta, A., Mohanty, T. K., Raina, V. S. 2010. Effect of cryopreservation on sperm chromatin integrity and fertilizing potential in bovine semen. *Livestock Science*. 136 (2011). 114-121.
- Mutalik, S., Salian, S. R., Avadhani, K., Menon, J., Joshi, H., Hegde, A. R., Kumar, P., Kalthur, G., Adiga, S. K. 2014. Liposome encapsulated soy lecithin and cholesterol can efficiently replace chicken egg yolk in human semen cryopreservation medium. *System Biology in Reproductive Medicine*. 60 (3). 183-188.
- Nagata, S. 1997. Apoptosis by death factor. *Cell*. 88. 355-365.
- Nakanishi, S., Adhya, S., Gottesman, M., Pastan, I. 1974. Activation of transcription at specific promoters by glycerol. *The Journal of Biological Chemistry*. 249. 4050-4056.
- Nava-Trujillo, H., Quintero-Moreno, A., Finol-Parra, G., Carruyo, G., Vilchez-Siu, V., Osorio-Meléndez, C., Rubio-Guillén, J., Valeris-Chacín, R. 2013. Relationship among damaged chromatin, motility and viability in cryopreserved spermatozoa from Brahman bulls. *Revista Colombiana de Ciencias Pecuarias*. 24 (2). 116-122.
- Neill, J. D. 2006. *Knobil and Neill's Physiology of Reproduction*. Academic press. London. p. 3296. ISBN: 978-0-12-515401-7.
- Nelson, R. G., Johnson, W. C. 1970. Conformation of DNA in ethylene glycol. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 41. 211-216.
- Nussbaum, R., McInnes, R. R., Willard, H. F., Hamosh, A. 2007. *Thompson & Thompson Genetics in Medicine*, seventh ed. Saunders. Elsevier Health Sciences. 12. 56-62.
- Nybo Andersen, A. M., Hansen, K. D. 2004. Advanced paternal age and risk of fetal death: a cohort study. *American Journal of Epidemiology*. 160. 1214-1222.
- O'ehninger, S., Duru, N. K., Srisombut, C., Morshedi, M. 2000. Assessment of sperm cryodamage and strategies to improve outcome. *Molecular Cell Endocrinology*. 169. 3-10.

Oko, R. 1998. Occurrence and formation of cytoskeletal proteins in mammalian spermatozoa. *Andrologia*. 30. 193-206.

Olson, G. E., NagDas, S. K., Winfrey, V. P. 2002. Structural differentiation of spermatozoa during posttesticular maturation. In *The Epididymis: From Molecules to Clinical Practice*. 371-387.

Ondrizek, R. R., Chan, P. J., Patton, W. C., King, A. 1999. An alternative medicine study of herbal effects on the penetration of zona-free hamster oocytes and the integrity of sperm deoxyribonucleic acid. *Fertility and Sterility*. 71 (3). 517-522.

Orthwein, A., Fradet-Turcotte, A., Noordermeer, S. M., Canny, M. D., Brun, C. M., Strecker, J., Escribano-Diaz, C., Durocher, D. 2015. Mitosis inhibits DNA double-strand break repair to guard against telomere fusions. *Science*. 344. 189-193.

Paasch, U., Sharma, R. K., Gupta, A. K., Grunewald, S., Mascha, E. J., Thomas, A. J., Glander, H. J., Agarwal, A. 2004. Cryopreservation and thawing is associated with varying extent of activation of apoptotic machinery in subsets of ejaculated human spermatozoa. *Biology Reproduction*. 71. 1828-1837.

Padron, O. F., Brackett, N. L., Sharma, R. K., Kohn, S., Lynn, C. M., Thomas, A. J., Agarwal, A. 1997. Seminal reactive oxygen species, sperm motility and morphology in men with spinal cord injury. *Fertility and Sterility*. 67. 115-1120.

Paoli, D., Gallo, M., Rizzo, F., Badi, E., Francavilla, S., Lenzi, A., Lombardo, F., Gandini, L. 2011. Mitochondrial membrane potential profile and its correlation with increasing sperm motility. *Fertility and Sterility*. 95 (7). 2315-2319.

Parks, J. E. 1997. Hypothermia and mammalian gametes. In *Reproductive Tissue Banking*. 229-261.

Perez-Crespo, M., Pintado, B., Gutierrez-Adan, A. 2008. Scrotal heat stress effects on sperm viability, sperm DNA integrity, and the offspring sex ratio in mice. *Molecular Reproduction Development*. 75 (1). 40-47.

- Peris, S. I., Bilodeau, J. F., Dufour, M., Bailey, J. L. 2007. Impact of cryopreservation and reactive oxygen species on DNA integrity, lipid peroxidation, and functional parameters in ram sperm. *Molecular Reproduction Development*. 74. 878-892.
- Perumal, P., Selvaraju, S., Selvakumar, S., Barik, A., Mohanty, D., Das, S., Das, R., Mishra, P. 2011. Effect of pre-freeze addition of cysteine hydrochloride and reduced glutathione in semen of crossbred Jersey bulls on sperm parameters and conception rates. *Reproduction Domestic Animals*. 46. 636-641.
- Pienta, K. J., Coffey, D. S. 1984. A structural analysis of the role of the nuclear matrix and DNA loops in the organization of the nucleus and chromosome. *Journal Cell Science Suppl*. 1. 123-135.
- Purdy, P. H. 2006. A review on goat sperm cryopreservation. *Small Ruminant Research*. 63. 215-225.
- Rajender, S., Avery, K., Agarwal, A. 2011. Epigenetics, spermatogenesis and male fertility. *Mutation Research*. 72. 62-71.
- Rajender, S., Rahul, P., Mahdi, A. A. 2010. Mitochondria, spermatogenesis and male infertility. *Mitochondrion*. 10 (5). 419-28.
- Rasul, Z., Anzar, M., Jalali, S., Ahmad, N. 2000. Effect of buffering systems on post-thaw motion characteristics, plasma membrane integrity, and acrosome morphology of buffalo spermatozoa. *Animal Reproduction Science*. 59. 31-41.
- Rasul, Z., Ahmad, N., Anzar, M. 2001. Changes in motion characteristics, plasma membrane integrity, and acrosome morphology during cryopreservation of buffalo spermatozoa. *Journal of Andrology*. 22. 278-283.
- Reichart, M., Kahane, I., Bartoov, B. 2000. *In vivo* and *in vitro* impairment of human and ram sperm nuclear chromatin integrity by sexually transmitted *Ureaplasma urealyticum* infection. *Biology Reproduction*. 63 (4). 1041-1048.

- Revel, A., Haimov-Kochman, R., Porat, A., Lewin, A., Simon, A., Laufer, N. 2005. *In vitro* fertilization/intracytoplasmic sperm injection success rates with cryopreserved sperm from patients with malignant disease. *Fertility and Sterility*. 84 (1). 118-122.
- Rubes, J., Selevan, S. G., Evenson, D. P., Zudova, D., Vozdova, M., Zudova, Z., et al. 2005. Episodic air pollution is associated with increased DNA fragmentation in human sperm without other changes in semen quality. *Human Reproduction*. 20 (10). 2776-2783.
- Saacke, R. G. 2008. Sperm morphology: its relevance to compensable and uncompensable traits in semen. *Theriogenology*. 70. 473-478.
- Said, T. M., Gaglani, A., Agarwal, A. 2010. Implication of apoptosis in sperm cryoinjury. *Reproductive BioMedicine Online*. 21 (4). 456-462.
- Sakkas, D., Seli, E., Bizzaro, D., Tarozzi, N., Manicardi, G. C. 2003. Abnormal spermatozoa in the ejaculate: abortive apoptosis and faulty nuclear remodelling during spermatogenesis. *Reproductive BioMedicine*. 7. 428-432.
- Salamon, S., Maxwell, W. M. 1995. Frozen storage of ram semen. 1. Processing, freezing, thawing and fertility after cervical insemination. *Animal Reproduction Science*. 37. 185-249.
- Saleh, R., Agarwal, A. 2002. Oxidative stress and male infertility: from research bench to clinical practice. *Journal of Andrology*. 23. 737-752.
- Saleh, R. A., Agarwal, A., Nada, E. S., El-Tonsy, M. H., Sharma, R. K., Meyer, A. 2003. Negative effects of increased sperm DNA damage in relation to seminal oxidative stress in men with idiopathic and male factor infertility. *Fertility and Sterility*. 79 (3). 1597-1605.
- Saleh, R. A., Agarwal, A., Sharma, R. K., Said, T. M., Sikka, S. C., Thomas, A. J. 2003. Jr. Evaluation of nuclear DNA damage in spermatozoa from infertile men with varicocele. *Fertility and Sterility*. 80. 1431-1436.
- Seligman, J., Zipser, Y., Kosower, N. S. 2004. Tyrosine phosphorylation, thiol status and protein tyrosine phosphatase in rat epididymal spermatozoa. *Biology of Reproduction*. 71. 1009-1015.

- Serafini, R., Love, C. C., Coletta, A., Mari, G., Mislei, B., Caso, C., Di Palo, R. 2016. Sperm DNA integrity in frozen-thawed semen from ItalianMediterranean Buffalo bulls and its relationship to in vivofertility. *Animal Reproduction Science*. 172. 26-31.
- Serafini, R., Romano, J. E., Varner, D. D., Palo, R. D., Love, Ch. C. 2015. Sperm DNA assays and their relationship to sperm motilityand morphology in bulls (*Bos Taurus*). *Animal Reproduction Science*. 159. 77-86.
- Shamsi, M. B., Imam, S. N., Dada, R. 2011. Sperm DNA integrity assai: diagnostic and prognostic challenges and implications in management of infertility. *Journal of assisted reproduction and genetics*. 28 (11). 1073-1085.
- Shamsi, M. B., Kumar, R., Dada, R. 2008. Evaluation of nuclear DNA damage in human spermatozoa in men opting for assisted reproduction. *Indian Journal Medical Res*. 127 (2). 115-123.
- Shamsi, M. B., Venkatesh, S., Tanwar, M., Singh, G., Mukherjee, S., Malhotra, N. 2010. Comet assay: a prognostic tool for DNA integrity assessment in infertile men opting for assisted reproduction. *Indian Journal Medical Res*. 131. 675-681.
- Shamsi, M. B., Venkatesh, S., Tanwar, M., Talwar, P., Sharma, R. K., Dhawan, A. 2009. DNA integrity and semen quality in men with low seminal antioxidant level. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*. 665 (1-2). 29-36.
- Sharma, R. K., Agarwal, A. 1996. Role of reactive oxygen species in male infertility. *Urology*. 48. 835-850.
- Sherman, J. K. 1990. Cryopreservation of human semen. In *Handbook of the Laboratory Diagnosis and Treatment of Infertility*. 229-259.
- Schill, W. B., Topfer-Petersen, E., Heissler, E. 1988. The sperm acrosome: functional and clinical aspects. *Human Reproduction*. 3 (2). 139-145.

- Sigman, M., Lopes, L. 1993. The correlation between round cells and white blood cells in the semen. *Journal of Urology*. 149 (5). 1338-1340.
- Sikka, S. C. 2001. Relative impact of oxidative stress on male reproductive function. *Current medicinal chemistry*. 8. 851-862.
- Singh, N. P., Muller, C. H., Berger, R. E. 2003. Effects of age on DNA doublestrand breaks and apoptosis in human sperm. *Fertility and Sterility*. 80. 1420-1430.
- Sinha Hikim, A. P., Swerdloff, R. S. 1999. Hormonal and genetic control of germ cell apoptosis in the testis. *Review of Reproduction*. 4. 38-47.
- Slama, R., Bouyer, J., Windham, G. 2005. Influence of paternal age on the risk of spontaneous abortion. *American Journal of Epidemiology*. 161. 816-823.
- Smith E. F., Yang P. 2004. The radial spokes and central apparatus: mechano-chemical transducers that regulate flagellar motility. *Cell Motility and the Cytoskeleton*. 5. 8-17.
- Spano, M., Bonde, J. P., Hjollund, H. I., Kolstad, H. A., Cordelli, E., Leter, G. 2000. Sperm chromatin damage impairs human fertility. The Danish First Pregnancy Planner Study Team. *Fertility and Sterility*. 73. 43-50.
- Stanic, P., Tandara, M., Sonicki, Z., Simunic, V., Radakovic, B., Suchanek, E. 2000. Comparison of protective media and freezing techniques for cryopreservation of human semen. *European Journal of Obstetrics Gynecology and Reproductive Biology*. 91 (1). 65-70.
- Stradaoli, G., Noro, T., Sylla, L., Monaci, M. 2007. Decrease in glutathione (GSH) content in bovine sperm after cryopreservation: comparison between two extenders. *Theriogenology*. 67. 1249-1255.
- Suarez, S. S., Ho, H. C. 2003. Hyperactivation of mammalian sperm. *Cell Molecular Biology (Noisy-le-grand)*. 49 (3). 351-356.
- Suarez, S. S., Pacey, A. A. 2006. Sperm transport in the female reproductive tract. *Human Reproduction Update*. 12 (1). 23-37.

- Sukhato, P., Thongsodseang, S., Utha, A., Songsasen, N. 2001. Effects of cooling and warming conditions on post-thawed motility and fertility of cryopreserved buffalo spermatozoa. *Animal Reproduction Science*. 67. 69-77.
- Sun, F., Ko, E., Martin, R. H. 2006. Is there a relationship between sperm chromosome abnormalities and sperm morphology? *Reproduction Biological Endocrinol*. 4. 1.
- Sutovsky, P., Manandhar, G., Wu, A., Oko, R. 2003. Interactions of the sperm perinuclear theca with the oocyte: implications for oocyte activation, anti-polyspermy defense and assisted reproduction. *Microscopy Research and Technique*. 61. 362-378.
- Tahir, M. N., Bajwa, M. A., Latif, M., Mushtaq, M., Shah, M. H. 1981. Effects of insemination dose and season on conception rates in buffaloes. *Pakistan Veterinary Journal*. 1. 161-163.
- Tapia, J. A., Macias-Garcia, B., Miro-Moran, A., Ortega-Ferrusola, C., Salido, G. M., Peña, F. J., Aparicio, I. M. 2012. The membrane of the mammalian spermatozoa: Much more than an inert envelope. *Reproduction in Domestic Animals*. 47 (3). 65-75.
- Tarozzi, N., Bizzaro, D., Flamigni, C., Borini, A. 2007. Clinical relevance of sperm DNA damage in assisted reproduction. *Reproduction Biomedical*. 14 (6). 746-757.
- Tasdemir, U., Büyükleblebici, S., Tuncer, P. B., Coskun E., Özgürtas, T., Aydın F. N., Büyükleblebici O., Gürçan, I. S. 2012. Effects of various cryoprotectants on bull sperm quality, DNA integrity and oxidative stress parameters. *Cryobiology*. 66. 38-42.
- Taylor, K., Roberts, P., Saunders, K., Burton, P. 2009. Effect of antioxidant supplementation of cryopreservation medium on post-thaw integrity of human spermatozoa. *Reproduction Biomedical*. 18. 184-189.
- Thachil, J. V., Jewett, M. A. S. 1981. Preservation techniques for human semen. *Fertility and Sterility*. 35 (5). 546-548.
- Thornberry, N. A., Lazebnik, Y. 1998. Caspases: enemies within. *Science*. 281. 1312-1316.

- Thun, R., Hurtado, M., Janett, F. 2002. Comparison of Biociphos-Plus® and TRIS-egg yolk extender for cryopreservation of bull semen. *Theriogenology*. 57 (3). 1087-1094.
- Tomlinson, M. J., White, A., Barratt, C. L. R., Bolton, A. E., Cooke, I. D. 1992. The removal of morphologically abnormal sperm forms by phagocytes: a positive role for seminal leukocytes. *Human Reproduction*. 7 (4). 517-522.
- Topraggaleh, T. R., Shahverdi, A., Rastegarnia, A., Ebrahimi, B., Shafiepour, V., Sharbatoghli, M., Esmaeili, V., Janzamin, E. 2014. Effect of cysteine and glutamine added to extender on post-thaw sperm functional parameters of buffalo bull. *Andrologia*. 46. 777-783.
- Toshimori, K., Tanii, I., Araki, S., Oura, C. 1992. Characterization of the antigen recognized by a monoclonal antibody MN9: Unique transport pathway to the equatorial segment of sperm head during spermiogenesis. *Cell Tissue Res*. 270. 459-468.
- Turner, R. M. 2003. Tales from the tail: what do we really know about sperm motility? *Journal of Andrology*. 24 (6). 790-803.
- Twigg, J., Fulton, N., Gomez, E., Irvine, D. S., Aitken, R. J. 1998. Analysis of the impact of intracellular reactive oxygen species generation on the structural and functional integrity of the human spermatozoa: lipid peroxidation, DNA fragmentation and effectiveness of antioxidants. *Human Reproduction*. 13. 1429-1436.
- Utt, M. D. 2016. Prediction of bull fertility. *Animal Reproduction Science*. 169. 37-44.
- Van der Heijden, G. W., Ramos, L., Baart, E. B., Van der Berg, I. M., Derijck, A. A., Van der Vlag, J., Martini, E., De Boer, P. 2008. Sperm derived histones contribute to zygotic chromatin in humans. *BMC Developmental Biology*. 8. 34.
- Varner, D. D., Scanlan, C. M., Thompson, J. A., Brumbaugh, G. W., Blanchard, T. L., Carlton, C. M., Johnson, L. 1998. Bacteriology of preserved stallion semen and antibiotics in semen extenders. *Theriogenology*. 50 (4). 559-573.



Venkatesh, S., Riyaz, A. M., Shamsi, M. B., Kumar, R., Gupta, N. P., Mittal, S. 2009. Clinical significance of reactive oxygen species in semen of infertile Indian men. *Andrologia*. 41 (4). 251-256.

Verstegen J., Iguer-Ouada M., Onclin K. 2002. Computer assisted semen analyzers in andrology research and veterinary practice. *Theriogenology*. 57. 149-179.

Věžník Z., Švecová D., Zajícová A., Přinosilová P. 2004. Repetitorium - spermatologie a andrologie a metodiky spermatoanalýzy. VÚVeL. Brno. 87 s. ISBN: 80-86895-01-7.

Wang, A. W., Zhang, H., Ikemoto, I., Anderson, D. J., Loughlin, K. R. 1997. Reactive oxygen species generation by seminal cells during cryopreservation. *Urology*. 49. 921-925.

Wang, Y. J., Zhang, R. Q., Lin, Y. J., Zhang, R. G., Zhang, W. L. 2012. Relationship between varicocele and sperm DNA damage and the effect of varicocele repair: a meta-analysis. *Reproduction Biomedical*. 25 (3). 307-314.

Ward, W. S., Coffey, D. S. 1990. Specific organization of genes in relation to the sperm nuclear matrix. *Biochemical and biophysical research communications*. 173. 20-25.

Ward, W. S., Coffey, D. S. 1991. DNA packaging and organization in mammalian spermatozoa: comparison with somatic cells. *Biological Reproduction* 44. 569-574.

Warren, J. S., Johnson, K. J., Ward, P. A. 1987. Oxygen radicals in cell injury and cell death. *Pathology and immunopathology research*. 6. 301-315.

Watson, P. F., Morris, G. J. 1987. Cold shock injury in animal cells. *Symp Soc Exp Biology*. 41. 311-340.

Watson, P. F. 1995. Recent developments and concepts in the cryopreservation of spermatozoa and the assessment of their post-thawing function. *Reproduction Fertility Development*. 7. 871-891.

- Watson, P. F. 2000. The causes of reduced fertility with cryopreserved semen. *Animal Reproduction Scientist*. 60. 481-492.
- Will, M. A., Swain, J., Fode, M., Sonksen, J., Christman, G. M., Ohl, D. 2011. The great debate: varicocele treatment and impact on fertility. *Fertility and Sterility*. 95. 841-52.
- Williams, M. C., Wenner, J. R., Rouzina, I., Bloomfield, V. A. 2001. Effect of pH on the overstretching transition of double-stranded DNA: evidence of force-induced DNA melting. *Biophysical Journal*. 80. 874-881.
- Wiltbank, J. N., Parish, N. R. 1986. Pregnancy rate in cows and heifers bred to bulls selected for semen quality. *Theriogenology*. 25. 779-783.
- Woelders, H. 2009. Basic principles of cryopreservation. *Cryopreservation of animal genetic resources*. 7. 83-94.
- Wu, T. F., Chu, D. S. 2008. Epigenetic processes implemented during spermatogenesis distinguish the paternal pronucleus in the embryo. *Reproduction Biomedical*. 16. 13-22.
- Wundrich, K., Paasch, U., Leicht, M., Glander, H. J. 2006. Activation of caspases in human spermatozoa during cryopreservation—an immunoblot study. *Cell Tissue Bank*. 7. 81-90.
- Wyrobek, A. J., Eskenazi, B., Young, S. 2006. Advancing age has differential effects on DNA damage, chromatin integrity, gene mutations, and aneuploidies in sperm. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*. 103. 9601-9606.
- Xiao, X., Mruk, D. D., Cheng, C. Y. 2013. Intercellular adhesion molecules (ICAMs) and spermatogenesis. *Human Reproduction* 19. 167-186.
- Yoshinaga, K., Toshimori, K. 2003. Organization and modifications of sperm acrosomal molecules during spermatogenesis and epididymal maturation. *Microscopy Research and Technique*. 61. 39-45.

Zielonka, J., Gebicki, J., Gryniewicz, G. 2003. Radical scavenging properties of genistein. *Free Radical Biology and Medicine*. 35. 958-965.

## 9 Seznam grafů a tabulek

<b>Graf 1:</b> Procentuální zastoupení motilních spermií před a po kryokonzervaci .....	30
<b>Graf 2:</b> Rozdíl pozitivních spermií metodou AO před a po kryokonzervaci v % .....	31
<b>Graf 3:</b> Rozdíl pozitivních spermií metodou TB před a po kryokonzervaci v % .....	32
<b>Graf 4:</b> Rozdíl metod AO a TB u nativních spermií v % .....	33
<b>Graf 5:</b> Rozdíl metod AO a TB u kryokonzervovaných spermií v % .....	33
<b>Graf 6:</b> Porovnání výsledků pozitivních spermií u býků 2, 3, 4 a 5 v % .....	34
<b>Graf 7:</b> Procentuální zastoupení pozitivních buněk nativních spermií a spermií po kryokonzervaci metodou AO a TB .....	35
<b>Tabulka 1:</b> Pearsonův koeficient korelace metod AO a TB .....	32

## 10 Přílohy

### Příloha č. 1: Protokol akridin oranž podrobný

1. Vytvořit z 20  $\mu$ l roztěr na podložní skličko a nechat zaschnout na vzduchu (zkoušela jsem i na vyhráté destičce a je to lepší – rychlejší)
2. Pomocí PAP PEN vytvořit obdélník cca 3x2 cm – ne menší, pak nevydrží
3. Fixace: 70  $\mu$ l Carnoy's (1 díl kyseliny octové:3 díly metanolu – namíchat si do zásoby a nechat v ledničce) roztokem minimálně dvě hodiny ve vlhké komůrce při 4 °C – po hodině zkontrolovat zda se roztok neodpařil a zda vydržel PAP PEN
4. Oplach: pomocí PBS (1x – 0,01 M) - 2x 1 ml
5. Barvení: akridin oranž (50  $\mu$ g na ml staining buffer\* - lze opět si připravit dopředu na více pokusů, zamrazit) 200  $\mu$ l přidání na preparát
6. Nechat 10 minut při pokojové teplotě, ale musí být ve tmě, nechat tedy ve vlhké komůrce, ale zakrýt alobalem
7. Oplach: pomocí PBS - 2x 1ml, nechat oschnout, ale opět ve tmě
8. Hodnocení fluorescenční mikroskop – fluorescenční filtr 488 nm, objektiv 40x

#### \*STAINING BUFFER

na 100 ml

0.2M Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	2,8392 g
1mM EDTA	0,0372 g
0.15 M NaCl	0.8766 g
0,1 M citric acid monohydrate	2,101 g

pH 6 – důležité, zkontrolovat!

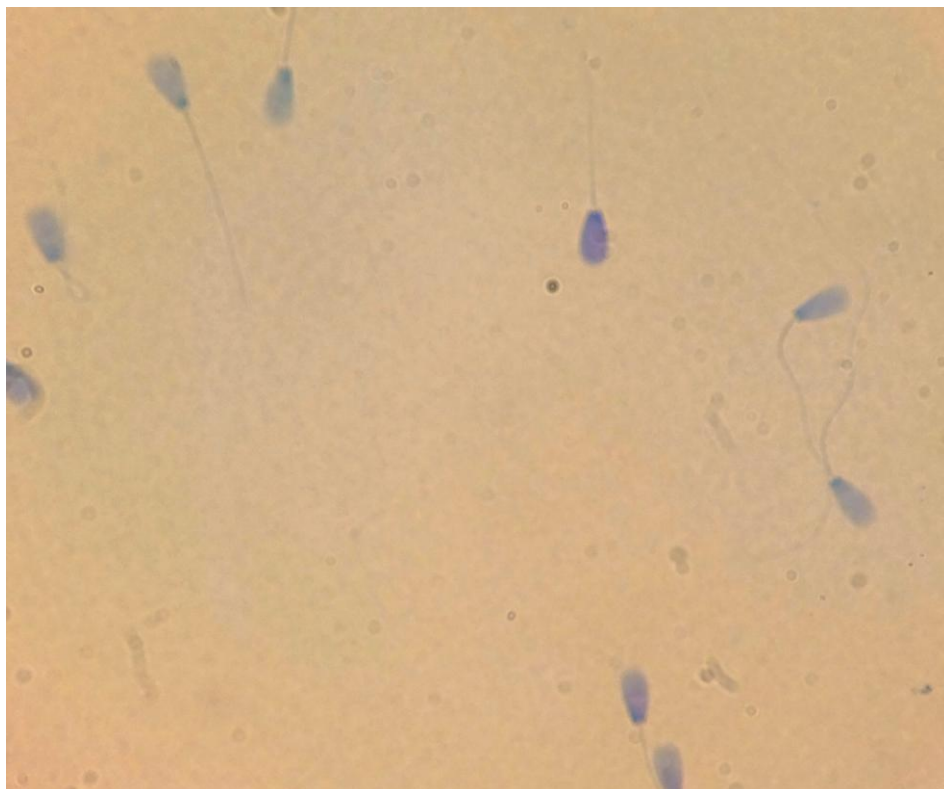
## **Příloha č. 2:** Protokol toluidinová modř podrobný

1. Vytvořit z 20  $\mu$ l naředěných spermií pomocí DPBS na  $10 \times 10^6$ /ml roztěr na podložní sklíčko a nechat zaschnout na vzduchu (zkoušela jsem i na vyhřáté destičce, je to sice rychlejší, ale dělají se shluky spermií)
2. Fixace: čerstvě připravený roztok 1:1 (96% ethanol/aceton), důležité je přesně odměřit a poté nechat promíchat, dát vychladit na 15 minut do 4°C, poté 30 minut 4°C v kyvetě
3. Inkubace: 0,1 N HCl 10 minut 4°C ve vlhké komůrce – 1,2 ml na sklíčko, pomocí PAP PEN vytvořit obdélník 3x2 cm, nechat zaschnout a nanášet HCl opatrně, pokud se dá rychle, tak PAP PEN nevydrží (zkoušelo se i 0,2-0,5 N HCl -> buňky byly obarveny všechny stejně)
4. Promývání: 3x demi H<sub>2</sub>O – 2 minuty v kyvetě na třepačce
5. Barvení: 0,1% toluidinové modři v McIlvaine – 1,2 ml na sklíčko – 10 minut RT, velmi důležité je zkontrolovat pH po namíchání McIlvaine – je nižší a tak ho chce dopravit, pokud se pH nekontroluje, metodika nefunguje
6. Oplach demi H<sub>2</sub>O
7. Hodnocení: světelný mikroskop 40x nebo imerzní olej a mikroskop 100x (pod imerzním olejem, jsou lépe vidět rozdíly, ovšem najít buňky je někdy opravdu nemožné, proč se nezjistilo)

\* McIlvaine, Mix A+B (7,71 : 12,29 ml), pH7 – důležité zkontrolovat!

Roztok A	5,068 g	NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> xH <sub>2</sub> O/100 ml
Roztok B	1,9212 g	Kyselina citrónová/100 ml

**Příloha č. 3:** Pohled do světelného mikroskopu metoda TB



**Příloha č. 4:** Pohled do fluorescenčního mikroskopu metoda AO

