

Univerzita Karlova v Praze

Přírodovědecká fakulta

Katedra buněčné a vývojové biologie

Studijní program: Biologie

Studijní obor: Reprodukční a vývojová biologie



Bc. Kristýna Vacková

**Využití metody interspecifické ICSI pro hodnocení kvality uchovávaného
biologického materiálu genetických zdrojů**

**Use of interspecific ICSI method for assessing the quality of the retained biological
material from genetic resources**

Diplomová práce

Vedoucí diplomové práce: RNDr. Michal Benc, Ph.D.

Konzultant diplomové práce: doc. RNDr. Ing. Vladimír Krylov, Ph.D.

Praha, 2022

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracovala samostatně a že jsem uvedla všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce, ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

V Praze, dne 4. 1. 2022

.....

Kristýna Vacková

Poděkování

Ráda bych tímto poděkovala svému školiteli RNDr. Michalovi Bencovi, Ph.D. za cenné rady a odborné vedení mé práce. Dále bych chtěla poděkovat především Ing. Josefu Fulkovi, jr., DrSc. za odbornou pomoc a cenné rady. Děkuji také Ing. Janě Rychtářové, Ph.D. za nepostradatelné rady, vytvoření příjemného pracovního prostředí a možnost zpracování mé diplomové práce na oddělení, kterého je vedoucí. Poděkování patří i konzultantovi diplomové práce doc. Ing. RNDr. Vladimíru Krylovovi, Ph.D. V neposlední řadě děkuji také mým rodičům za jejich podporu a pochopení v průběhu celého studia.

Tato práce byla finančně podpořena grantem NAZV QK1910156: „Nové postupy pro záchranu ohrožených populací hospodářských zvířat“.

Abstrakt

Intracytoplasmatická injekce spermie, neboli ICSI, je metoda běžně používaná v centrech asistované reprodukce a zároveň je efektivním nástrojem pro výzkum oplození. Metoda interspecifické ICSI je vhodná pro produkci zygot, které vznikají spojením gamet odlišného, vzdáleně nepříbuzného druhu. Dokáže obejít přirozené mezidruhové bariéry a vytvořit tzv. interspecifické zygoty. Toho se dá využít při hodnocení vlastností gamet ohrožených druhů živočichů. V této práci byla metoda použita pro hodnocení kvality uchovávaného spermatu kozlů z genetického zdroje kozy bílé krátkosrsté.

Cílem práce bylo vyhodnotit vliv kryoprezervace na kvalitu spermatu kozlů, které bylo mražené třemi rozdílnými způsoby na dvou různých chovatelských stanicích.

Jako kontrolní skupina sloužilo čerstvě odebrané sperma. Do maturovaných myších oocytů byly injikovány hlavičky xenogenních kozlích spermií. Injikované oocyty se nechaly vyvíjet do stadia zygoty, ve kterých se vytvořilo jak samičí (myší), tak samčí (koslí) prvojádře. V samčím prvojádře se hodnotilo DNA poškození pomocí imunofluorescenčního barvení protilátkou proti γ H2AX, což je marker DNA zlomů.

Výsledky získané měřením hladiny intenzity fluorescence γ H2AX v paternálních prvojádrech ukazují, že se sledované hodnoty mezi jednotlivými skupinami liší. Nejnižší hodnoty intenzity fluorescence, a tedy nejnižší poškození DNA, byly prokázány u čerstvého spermatu ($11,93 \pm 8,06$). Rozdílnost byla prokázána i mezi skupinami mraženého spermatu. Byl potvrzen vliv různých metod odběru a zmrazování spermatu a vliv složení zamrazovacího média. Nejvyšší hodnoty intenzity fluorescence byly zjištěny u zamrazovacího média s přídavkem vaječného žloutku ($39,23 \pm 8,06$).

Tato metoda hodnocení kvality genetického materiálu zvířat zařazených do genetických zdrojů a do budoucna i ohrožených druhů zvířat je relativně jednoduchá a levná metoda, která může nahradit předchozí techniky hodnocení kvality spermií. Její výhodou je možnost nahrazení těžko dostupných oocytů ohrožených druhů snadno dostupnými myšími oocyty.

Klíčová slova

ICSI, biodiverzita, genové zdroje, spermie

Abstract

Intracytoplasmic sperm injection, or ICSI, is a commonly used method in assisted reproduction centers and is also an effective tool for a fertilization research. The interspecific ICSI is the suitable method for production of zygotes, which are formed by association of gametes of different, distantly unrelated species. It can bypass natural interspecies barriers and create so-called interspecific zygotes. This can be used to evaluation properties of genetic material. In this work, this method was used for evaluation of the quality of stored sperm originating from male goats of the white shorthair goat genetic resource.

The aim of this work was to evaluate the effect of cryopreservation on the quality of goat sperm, which was frozen in three different ways at two different breeding stations. Freshly collected semen served as a control group. The heads of xenogeneic goat sperm were injected into mature mouse oocytes. The injected oocytes were allowed to develop to the zygote stage, in which both female (mouse) and male (goat) pronuclei was formed. In male pronuclei, DNA damage was assessed by immunofluorescence staining with anti- γ H2AX antibody, a marker of DNA breaks.

The results obtained by measuring the level of γ H2AX fluorescence intensity in the paternal pronuclei show that the values differ between the individual groups of semen. The lowest values of fluorescence intensity, and thus the lowest DNA damage, were found in freshly collected semen (11.93 ± 8.06). Variability was also demonstrated between the experimental groups of frozen semen. The influence of different methods of semen collection and its freezing and the influence of the composition of the freezing medium were confirmed. The highest values of fluorescence intensity were found in the freezing medium with the additioned egg yolk (39.23 ± 8.06).

This method of assessing the quality of gametes of genetic resources animals and, in the future, endangered animal species, is a relatively simple and inexpensive method that can replace previous sperm quality assessment techniques with the advantage of replacing hard-to-reach oocytes of endangered species with readily available mouse oocytes.

Key words

ICSI, biodiversity, gene sources, sperm

Seznam použitých zkratek

ATP – adenosine triphosphate, adenosin trifosfát

BSA – bovine serum albumin, albumin z bovinního séra

BUSgp60 – bulbourethral 60 kDa protein, bulbouretrální 60 kDa protein

Ca²⁺ - calcium cation, vápenatý kationt

CMA3 – chromomycin A3

CO₂ – carbon dioxide, oxid uhličitý

ČZU – Česká zemědělská univerzita

DAPI – 4',6-diamidin-2-fenylindol, fluorescenční barvivo

DMSO – dimethyl sulfoxide, dimethylsulfoxid

DNA – deoxyribonucleic acid, deoxyribonukleová kyselina

DNA pol I – DNA polymerase I, DNA polymeráza I

DTT – 1,4-dithiothreitol, dithiotreitol - nízkomolekulární redukční činidlo

dUTP – 2'-Deoxyuridine, 5'-Triphosphate, deoxyuridine trifosfát

EmbryoMax KSOM – mouse embryo medium, medium pro myší embrya

EYCE – egg yolk coagulating enzyme, enzym koagulující vaječný žloutek

FSH – follicle-stimulating hormone, folikuly stimulující hormon

H2A – histone H2A, histon H2A

H2A1, H2A2, H2AX, H2AZ – varianty histonu H2A

γH2AX – fosforylovaná forma histonu H2AX, která se objevuje krátce po vzniku zlomu na DNA

H₂O₂ – hydrogen peroxide, peroxid vodíku

hCG – human chorionic gonadotropin, lidský choriový gonadotropin

ICSI – intracytoplasmic sperm injection, intracytoplazmatická injekce spermií

iICSI – interspecifická ICSI, mezidruhová ICSI

pICSI – piezo ICSI

IP3 – inositol trisphosphate, inositoltrisfosfát

ISNT – In situ nick translation, in situ nick translace – detekce zlomů v DNA řetězci v tkáňových řezech na buněčné úrovni

M2 – médium M2

mAb – monoclonal antibody, monoklonální protilátka

MAPK – mitogen-activated protein kinase or MAP kinase, MAP kináza

MPF – maturation-promoting factor, faktor podporující zrání

PBS – phosphate buffered saline, fosfátový pufr

pH – potential of hydrogen, vodíkový exponent

PLC ζ – phospholipase C, fosfolipáza C

PMSG – pregnant mare's serum gonadotropin, koňský choriový gonadotropin

PN 4, 5 – pronuclear stage 4, 5, pronukleární stádium 4, 5

PVP – Polyvinylpyrrolidone, polyvinylpyrrolidon

PZD – partial zona dissection, parciální disekce zona pellucida

RNA – ribonucleic acid, ribonukleová kyselina

ROS – reactive oxygen species, reaktivní formy kyslíku

SCD test – sperm chromatin dispersion test, test disperze chromatinu ve spermatu

SCGE – single cell gel electrophoresis, jednobuněčná gelová elektroforéza

SCSA – sperm chromatin structure assay, stanovení chromatinové struktury spermií

SUZI – subzonal insemination, subzonální inseminace

TdT – terminal deoxynucleotidyl transferase, terminální deoxynukleotidyltransferáza

TUNEL – Terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP nick end labeling, označování koncových deoxynukleotidyltransferáz dUTP

Obsah

1	Úvod.....	1
2	Přehled literatury.....	3
2.1	ICSI.....	3
2.1.1	Piezo ICSI.....	4
2.1.2	Interspecifická ICSI.....	6
2.2	Genetické zdroje	6
2.3	Možné metody uchování biologického materiálu (spermí).....	8
2.3.1	Kryoprezervace.....	8
2.3.2	Lyofilizace	14
2.4	Poškození DNA spermie	15
2.5	Metody pro hodnocení poškození, integrity DNA spermie.....	16
2.5.1	TUNEL	17
2.5.2	In situ nick translation (ISNT).....	18
2.5.3	SCSA	18
2.5.4	SCD	18
2.5.5	Kometový test.....	19
2.5.6	Barvení akridinovou oranží	19
2.5.7	Barvení anilinovou modří.....	20
2.5.8	Barvení chromomycinem A3 (CMA3).....	20
2.5.9	Barvení Toluidinovou modří	20
2.5.10	Imunofluorescenční barvení proti γ H2AX	20
2.6	Vliv poškození DNA na oplození.....	22
3	Cíle práce	24
4	Materiál a metody	24
4.1	Přehled použitých organismů, chemikálií a přístrojů	24

4.1.1	Modelové organismy	24
4.1.2	Použité chemikálie.....	25
4.1.3	Roztoky.....	25
4.1.4	Použité přístroje.....	26
4.1.5	Ostatní materiál	27
4.2	Metody.....	27
4.2.1	Výroba mikromanipulačních pipet	27
4.2.2	Hormonální stimulace superovulace myši.....	28
4.2.3	Izolace oocytů.....	29
4.2.4	Spermie.....	30
4.2.5	Mikromanipulace.....	32
4.2.6	γ H2AX imunofluorescenční barvení.....	35
4.2.7	Vyhodnocení intenzity fluorescence	35
4.2.8	Statistická analýza	36
5	Výsledky	36
5.1	Ovulace myších oocytů	36
5.2	ICSI.....	36
5.3	Hodnocení DNA poškození.....	38
6	Diskuze	41
7	Souhrn.....	48
8	Seznam použité literatury.....	49

1 Úvod

V posledních letech rapidně ubývají nejen ohrožené druhy zvířat, ale i plemena hospodářských zvířat, která patří do kategorie genetických zdrojů. Z důvodu jejich omezeného počtu by v budoucnu mohl nastat problém s jejich přirozenou reprodukcí. Proto je potřeba zdokonalit techniky uchovávání genetického materiálu a vyvinout co nejlepší metody, kterými provádět případnou artifiční inseminaci a hodnocení kvality genetického materiálu. Z důvodu malého množství genetického materiálu ohrožených zvířat je potřeba vyvinout metody, a to hlavně metody na hodnocení kvality, které zamezí plýtvání cenného genetického materiálu. Využití metody interspecifické intracytoplazmatické injekce spermie (iICSI) se zdá být vhodným nástrojem na hodnocení kvality uchovávaných spermií. Tím, že se injikuje spermie přímo do cytoplazmy oocyty se dají obejít mezidruhové bariéry a použít gamety z odlišných druhů. Metoda ICSI se běžně používá v centrech asistované reprodukce, zejména v případech, kdy spermie nejsou plně funkční. Tedy pokud jsou spermie nepohyblivé, neschopné projít obaly oocyty, zahájit akrozomální reakci či z jiných důvodů neschopnosti oplození oocyty. ICSI se může použít také v případě, kdy se v ejakulátu nenacházejí maturované spermie a je nutné chirurgicky odebrat nezralé spermie, které ale nejsou schopné oplodnit oocyt přirozenou cestou. ICSI totiž umožňuje překročení kroků, ke kterým dochází během přirozeného oplození v reprodukčním traktu samice, jako je kapacitace, akrozomální reakce, rozpoznání a fúze gamet. První úspěšná metoda ICSI, kdy se narodilo dítě, byla popsána ve studii Gianpiera Palerma v roce 1992 (Palermo et al., 1992). Metoda injekce spermie do oocyty se ale vyvíjela už dlouhou dobu před tím. První úspěšná injekce spermie s výsledkem oplozeného oocyty byla provedena na křeččích gametách už v roce 1976 (Uehara a Yanagimachi, 1976).

V předkládané práci je metoda iICSI použita na hodnocení poškození DNA spermií po kryoprezervaci. Při kryoprezervaci dochází k velkým teplotním změnám, které mohou spermie poškodit. V této práci byla hodnocena kvalita spermií plemene koza bílá krátkosrstá, které je zařazeného do genetických zdrojů. Do genetických zdrojů je v České republice zařazeno 35 plemen hospodářských zvířat. Jedná se o různá plemena skotu, prasat, koz, ovcí, koní, ovcí, králíků, ryb, drůbeže, nutrií a dalších. Do genetických zdrojů koz se řadí koza hnědá krátkosrstá a koza bílá krátkosrstá (Sztankóová et al., 2009). V diplomové práci jsou porovnávány 4 skupiny spermatu. První je kontrolní skupina čerstvého spermatu. Další 3 skupiny spermatu

jsou kryoprezervované. K hodnocení kozlího spermatu pomocí iICSI byly použity snadno dostupné myší oocyty.

Fragmentace DNA se běžně hodnotí na maturovaných spermiích pomocí metod, jako je TUNEL, kometový test, SCD, nabarvení akridinovou oranží a podobně. Interspecifická ICSI je nástroj, pomocí kterého se dá měřit poškození DNA v paternálním prvojádře, kde je DNA dekonzenzovaná a metoda lépe znázorňuje místa a četnost zlomů. Samčí prvojádře je v myších zygotách vždy větší než samičí. Tato vlastnost je zachována, až na výjimky, i v případě použití spermií z jiného druhu. Navíc jsou viditelné zlomy, které spermie přináší do oocytu a které jsou důležité pro následný embryonální vývoj. DNA zlomy v prvojádře jsou zviditelněny pomocí protilátky proti γ H2AX, která se běžně používá jako marker zlomů DNA v somatických buňkách. K vyhodnocení výsledků je pak potřeba pouze fluorescenční mikroskop a program na měření intenzity fluorescence (ImageJ).

Tato metoda by v budoucnu mohla být použita i pro hodnocení kvality spermatu a následnému výběru optimálního způsobu uchovávání. Navíc možnost použití snadno dostupných myších oocytů výrazně šetří vzácný genetický materiál a pro hodnocení DNA poškození spermie po oplození není nutné obtížně získávat samičí gamety stejného druhu.

2 Přehled literatury

2.1 ICSI

Metoda ICSI, tedy intracytoplasmatická injekce spermie se dnes běžně používá v centrech asistované reprodukce primárně pro případy, kdy spermie nejsou schopné samy projít přes obaly oocyту a oplodnit ho z důvodu jejich velmi nízké či nulové motility. Jedná se především o poruchu zvanou astenospermie. Jedná se o stav, kdy je v ejakulátu málo pohyblivých spermií. Díky ICSI je možné použít i nezralé spermatidy, pokud se v ejakulátu žádné maturované spermie nenachází (Schlegel a Girardi, 1997). ICSI v humánní medicíně měla úspěch poprvé v roce 1991, kdy došlo k úspěšnému oplození lidského oocyту. Tato průlomová metoda, která se s mírnými modifikacemi používá dodnes se povedla omylem při metodě subzonální inseminace (SUZI), kdy dochází k injekci spermie pouze pod zona pellucida oocyту. Spermie pronikla až do cytoplazmy oocyту a došlo k jeho oplození (Palermo et al., 1992). První zmínka o vytvoření prvojader po ICSI byla ale publikována už dávno předtím na modelu křeččích gamet (Uehara a Yanagimachi, 1976). ICSI lze použít i na přípravu transgenních živočichů. Prvním transgenním živočichem vytvořeným metodou ICSI bylo prase (Kurome et al., 2006, García-Vázquez et al., 2010).

Mechanické poškození membrány spermie těsně před injekcí spouští aktivaci oocyту, stejně jako k tomu dochází fyziologicky při normálním oplození. Fosfolipáza $C\zeta$ se rozprostře do oocyту a spouští fosfoinositidovou dráhu, která končí únikem vápenatých iontů z endoplazmatického retikula (Albertini, 2015, Anifandis et al., 2016, Sanusi et al., 2015, Meerschaut et al., 2014). Po splynutí spermie a oocyту u normálního, fyziologického oplození, spermie spustí aktivaci oocyту, která umožňuje nastartování raného embryonálního vývoje. Prvními kroky po aktivaci jsou znovuzahájení meiózy, vyloučení druhého pólového tělíska, vyloučení obsahu kortikálních granul a formování samčího a samičího prvojádra (Alberio et al., 2001, Swann and Lai, 2016). Aktivace oocyту je spuštěná oscilací vápníku v ooplasmě (Stricker, 1999). Faktor zodpovědný za oscilace u savců je izoforma fosfolipázy C, která je specifická pro spermie, konkrétně $PLC\zeta$ (Saunders et al., 2002, Yoon a Fissore, 2007). $PLC\zeta$ vstoupí do ooplasmy po fúzi gamet a katalyzuje hydrolýzu fosfatidylinositolu 4,5- bisfosfátu za vzniku inositol trifosfát a diacylglycerolu. IP_3 se naváže na svůj receptor na membráně

endoplazmatického retikula a indukuje uvolnění vápenatých iontů do cytosolu. Ca^{2+} vrcholy způsobují snížení množství MPF a MAPK, jejichž množství je nejvyšší před oplozením (Jones, 2005).

Po ICSI u některých druhů nedochází k aktivaci oocyty samotnou spermíí, a to například u skotu. Aktivace se v tomto případě provádí uměle (Malcuit et al. 2006a). Bez aktivace nejsou spermie v zygotě schopné dekonenzovat a vytvořit prvojádro (Malcuit et al. 2006b, Arias et al., 2015).

U malých populací ohrožených druhů zvířat ubývá genetická diverzita kvůli vyšší šanci inbreedingu, a tím pádem dochází k vyšší produkci homozygotů (Roldan et al., 2006). Tím se snižuje schopnost adaptace a zvyšuje risk dědičných chorob, kongenitálních poruch a snižuje se plodnost (Andrabi a Maxwell, 2007). V mnoha případech mají tyto druhy omezenou kvalitu spermatu, což znesnadňuje přirozenou fertilizaci nebo asistovanou reprodukci (Koester et al., 2015). ICSI může tyto problémy vyřešit díky možnosti použít i nekvalitní, nepohyblivé či dokonce mrtvé spermie, pokud je zachována jejich genetická informace. Navíc je možné produkovat potomky z gamet uhynulých zvířat (Fernandez-Gonzalez et al., 2015), zvýšit šanci na oplození nekvalitním spermatem (Choi et al., 2016) nebo nekvalitním oocytem (Catalá et al., 2012, Ohlweiler et al., 2013). Tato metoda navíc umožňuje výběr morfologicky normálních spermíí (Penfold et al., 2003). ICSI umožňuje reprodukci divokých zvířat, které se nenachází na stejném místě. (jsou v jiné zoologické zahradě nebo na jiném místě jejich přirozeného habitatu), nezáleží na čase, dají se použít kryoprezervované nebo jinak uchovávané spermie a mohou být použité dokonce i spermie, které nejsou optimálně zamražené nebo zmražené v malém množství. V budoucnu by mohla ICSI pomoci při zachování genetické diverzity ohrožených druhů savců, a to hlavně těch, které jsou blízce příbuzné s domestikovanými druhy, pro které je použití ICSI již úspěšné (Salamone et al., 2017).

2.1.1 Piezo ICSI

Oocyty některých druhů zvířat mají při konvenční ICSI velmi malou úspěšnost přežití a fertilizace kvůli citlivé plazmatické membráně. Tento jev je pozorován zejména u myší. Byla proto vyvinuta modifikace, kdy jsou pomocí pieza generovány slabé elektrické pulzy, které velmi jemně rozechvějí injekční pipetu. Pipeta se díky tomu jednoduše a citlivě dostane přes buněčné obaly oocyty. Umožňuje proniknutí membránou s minimálním narušením oocyty.

Přítomnost kapky rtuti v blízkosti špičky kapiláry zvyšuje schopnost proniknutí skrze zona pellucida a cytoplazmatickou membránu. Zajistí, aby byl elektrický pulz dobře veden a zároveň stabilizuje pipetu a zpřesní tak průnik přes obaly. Tato metoda byla poprvé použita na myším modelu. Při piezo ICSI je mikromanipulační pipeta rovně odlomená, na rozdíl od konvenční ICSI, kdy je mikromanipulační pipeta zkosená, aby měla hrot, pomocí kterého protne obaly oocyty (Kimura a Yanagimachi, 1995).

V poslední době se vyvíjejí další látky, které nejsou toxické jako rtuť, aby bylo možné je použít v humánní medicíně. Jedná se o netoxické látky na bázi fluorouhlíkových sloučenin (Salgado et al., 2018, Hiraoka and Kitamura, 2015, Morita et al., 2012). U lidí může být piezo ICSI pro úspěšnou fertilizaci a následný vývoj do blastocysty účinnější, a to hlavně pro pacientky ve věku nad 35 let. S věkem se snižuje viskozita cytoplazmy a stává se citlivější na mikromanipulaci (Furuhashi et al., 2019). Piezo ICSI zlepšuje podíl oplozených oocytů, ale podle studie Fujiiho a kol. nebyly zjištěny rozdíly ve vývoji do blastocysty, úspěšné implantaci embrya, podílu potratů, podílu narozených dětí, gestačním věku, porodní váze, podílu chlapců, podílu porodů císařským řezem a množstvím vrozených vad mezi skupinami po piezo ICSI a konvenční ICSI (Fujii et al., 2020).

Na koňském modelu bylo dokázáno, že po piezo ICSI dochází k rychlejšímu nástupu dekondenzace chromatinu ve spermii a znovuzahájení meiózy než po konvenční ICSI. Kvalita blastocyst byla také lepší než po konvenční ICSI (Salgado et al., 2018).

Při piezo ICSI se spermie imobilizují piezem. U takových spermii dochází k rychlejšímu narušení plazmatické membrány (Yanagida et al., 2001), což je důležité pro efflux a aktivaci oocyty spermii, než u spermii imobilizovaných normální konvenční technikou, tj zlomením bičíku přiložením pipety.

Pomocí piezo-elektrických impulsů je možné provést narušení akrozomové membrány a následného vylití akrozomu ještě před samotnou injekcí spermie do oocyty. Porušením plazmatické membrány lze také aktivovat spermii. Toto mechanické porušení plazmatické a akrozomální membrány spermie se zdá být účinnější než chemická aktivace spermie (například ionomycinem, tritonem) a zlepšuje se tak vývoj embrya až do fáze blastocysty. Velká část spermii (46 %) prochází akrozomální reakcí při manipulaci s piezem (Anzalone et al., 2016).

2.1.2 Interspecifická ICSI

Interspecifická ICSI probíhá za použití gamet odlišných druhů zvířat. Oproti tomu intraspecifická ICSI používá gamety ze stejného živočišného druhu. iICSI je možné použít k hodnocení spermatu z pohledu schopnosti oplození, kdy vytvoření dvou odlišných prvojader je prokazatelnou známkou úspěšného oplození. U použití gamet podobných druhů se mohou interspecifická embrya vyvíjet až do stadia blastocysty, konkrétně v případě použití oocytů kočky domácí a spermií divokých kočkovitých šelem, geparda a leoparda. Tato možnost je výhodná hlavně v případě, že se jedná o divoké druhy ohrožených zvířat, kdy je dostupnost samičího genetického materiálu velmi omezená. Je tedy vhodné reprodukční schopnosti ohrožených druhů zvířat zkoumat pomocí iICSI s využitím dostupnějších oocytů jiného druhu zvířete. V případě příbuzných druhů je vývoj do blastocysty úspěšný i bez aktivace oocytu po ICSI, znamená to tedy, že spermie podobného druhu jsou dokonce schopné aktivovat oocyt (Moro et al., 2014). Ve studii Kaneka a kol. byla použita iICSI pro prokázání schopnosti oplození (tedy vytvoření maternálního i paternálního prvojádra) u druhů, které nejsou příbuzné. V tomto případě byly použity oocyty myši a spermie šimpanze, žirafy, jaguára, lasičky a potkana. V tomto případě byla testována schopnost oplodnit oocyt lyofilizovanými spermii (Kaneko et al., 2014). Myši oocyty jsou často používaným modelem pro iICSI pro prokázání fertility spermií různých savců (Lee et al., 1996, Watanabe et al., 2010).

2.2 Genetické zdroje

Podle Dohody o biologické rozmanitosti je genetický zdroj definován jako „Živý materiál obsahující geny s bezprostřední nebo potenciální hodnotou pro lidstvo.“ (Convention on Biodiversity, CBD, 1992). U mnoha živočišných druhů dochází ke ztrátě biodiverzity nebo dokonce dochází ke kritickému poklesu populace. A to jak u zvířat žijících ve volné přírodě, tak u spousty významných plemen hospodářských zvířat. Lokální plemena, která jsou dobře adaptovaná na specifické prostředí, ubývají a jsou nahrazována plemeny, která jsou z průmyslového hlediska zajímavější a produktivnější (FAO, 2015). Původní plemena hospodářských zvířat si zachovávají mnoho prospěšných vlastností, mezi které patří dobrá přizpůsobivost na prostředí, odolnost vůči klimatickým stresům, odolnost proti lokálním patogenům a parazitům. Některé tyto vlastnosti chybí moderním plemenům hospodářských

zvířat, která jsou vyšlechtěná pro intenzivní průmyslovou produkci živočišných produktů. Výrazným šlechtěním těchto moderních plemen, jejichž chov je mimo jiné finančně výhodnější, klesá počet původních plemen, čímž se z populace ztrácejí významné geny, které mohou přispívat ke zlepšení zdraví nových populací. V budoucnu, kdy dojde k vyčerpání proměnlivosti znaků a vlastností, bude nutnost využít genetický potenciál těchto plemen. Díky intenzivnímu šlechtění klesá genetická proměnlivost populací hospodářských zvířat. Genetické zdroje jsou cenným zdrojem genů, které mají vysoký biologický a hospodářský potenciál a patří do kulturního dědictví. Existuje několik způsobů pro zachování genových rezerv. Prvním způsobem je program *in situ*. Ten spočívá v ochraně zvířat v jejich přirozeném prostředí se snahou o udržení dostatečně velké populace a biodiverzity. Je tak zajištěna vyšší šance jejich přežití. Program zachování *in situ* podporuje genetickou rozmanitost. Tento způsob je ale velice nákladný, protože je potřeba mít k dispozici dostatečný počet nepřibuzných samčích linií. Metoda *in situ* umožňuje adaptaci na měnící se prostředí. Druhou možností je ochrana *ex situ*. Ta se dále dělí na *in vivo* a *in vitro*. Program *in vivo* představuje chov malé skupiny zvířat mimo jejich přirozené prostředí, například ve výzkumných nebo záchranných střediscích, v chovných stanicích, zoologických zahradách a ekologických centrech. Program *in vitro* spočívá v uchovávání genetického materiálu pomocí kryoprezervace. Je tak možné uchovávat sperma, embrya, oocyty, kmenové buňky nebo tkáně ohrožených zvířat. Kryoprezervovaný materiál je uchováván v genobankách. Genobanky musí splňovat určitá kritéria, aby v nich mohl být uchováván genetický materiál. Mezi tato kritéria patří například konstrukční odolnost vůči všem přírodním vlivům, biologická bezpečnost, možnost připojení k internetu a vedení evidence. Je nutné dodržovat velice propracovaný provozní řád a bezpečnostní opatření nebo zhotovení duplikátů důležitých materiálů, které jsou uloženy v jiné genobance (Martyniuk et al., 2018, Weigel et al., 2001).

V České republice se do kategorie genetických zdrojů řadí plemena hospodářských zvířat: česká červinka, český strakatý skot, koza bílá krátkosrstá, koza hnědá krátkosrstá, šumavská ovce, valašská ovce, huculský kůň, starokladrubský kůň, slezský norický kůň, českomoravský belgický kůň, přeštické černostrakaté prase, dále zástupci plemen drůbeže, králíků, nutrií, ryb a včel. Ochrana těchto plemen je pod záštitou Národního Programu, tento program je aktualizovaný každých 5 let (Mátlová, 2013).

2.3 Možné metody uchování biologického materiálu (spermií)

2.3.1 Kryoprezervace

Načasování odběru oocytů je omezeno sezónně, u ohrožených druhů je těžké odebrat ve stejný čas jak spermie, tak oocyty. Spermie, jejichž odběr a uchování je jednodušší než odběr a uchování oocytů, mohou být kryoprezervovány a podle potřeby využity pro oplození. Jedná se o metodu uchování spermatu, která je v současné době nejpoužívanější pro dlouhodobé uchování materiálu z geneticky kvalitních samců, významných transgenních linií a ohrožených druhů (Bailey et al., 2003, Bailey et al., 2000). Kryoprezervace je v reprodukční biologii velmi důležitá. Slouží k uchování gamet a embryí, umožňuje skladování genových rezerv a podporuje šlechtitelský program pro vzácné a ohrožené druhy, ale i ubývající druhy hospodářských a domácích zvířat (Sharma a Sood, 2020).

Bohužel při tomto způsobu uchovávání dochází k drastickým změnám, které jsou zapříčiněny zejména výraznými změnami teplot. Během tohoto procesu vzniká biochemické i funkční poškození uchovávaného materiálu (Leboeuf et al., 2000). Mimo jiné dochází k tvorbě ledových krystalů, které mohou mechanicky poškodit buňky. Navíc jsou buňky v průběhu kryokonzervace vystaveny fyzikálnímu, chemickému, osmotickému a oxidativnímu stresu, který potlačuje kvalitu spermií a následně i jejich schopnost oplodnit oocyt (Ezzati et al., 2020, Amidi et al., 2016, Watson, 1995). Spermie pocházející z různých živočišných druhů jsou různě náchylné k poškození během kryoprezervace. A to hlavně v závislosti na velikosti, tvaru, lipidovém a proteinovém složení spermie (Lv et al., 2019). Těmto problémům lze předcházet přidáním kryoprotektiv a dalších složek mrazicího média, které tyto přirozené děje částečně eliminují. Další opatření pro úspěšnou fertilizaci je způsob, jak se při mražení mění teplota. U některých druhů závisí i na období, v kterém se sperma odebírá (Yeste, 2016). To může ovlivnit odolnost vůči mražení (takzvanou kryotoleranci). Teplejší období, hlavně v období letních měsíců, negativně ovlivňuje plodnost kvůli teplotnímu stresu, který má negativní vliv na samčí i samičí reprodukční trakt (Perumal et al., 2017, De Rensis a Scaramuzzi, 2003). Kvalita spermatu v nereprodukčním období může být snížena změnami ve složení membrány spermie, ke kterým dochází během spermatogeneze. V průběhu ročních období se mění proliferační aktivita zárodečných buněk a Sertoliho buněk (Martínez-Fresneda et al., 2019). Mění se také obsah fosfolipidů, cholesterolu a různých proteinů spermie. Jedná se zejména o proteiny, které

jsou složkou semenné plazmy (Argov-Argaman et al., 2013, Westfalewicz et al., 2019). Jsou to proteiny, které se po ejakulaci připojují na plazmatickou membránu a chrání ji před poškozením způsobeným mrazem (Muiño-Blanco et al., 2008). Proteiny semenné plazmy, jejichž koncentrace se zvyšuje v reprodukčním období, jsou spojeny hlavně s regulací metabolismu lipidů, prevencí předčasné kapacitace a ochranou před teplotním šokem (Domínguez et al., 2008, Leahy et al., 2010). Složky extenderů mrazícího media a způsob mražení se vybírají na základě živočišného druhu vzhledem k rozdílným potřebám. Rozdíly v mrazitelnosti spermií ale nejsou jen mezi druhy, ale i mezi jedinci. Existují proteiny spermie, které se dají označit jako biomarkery mrazitelnosti a jejichž pomocí se dá odhadnout, jaký samec bude lépe snášet kryoprezervaci a bude mít kvalitní spermie schopné úspěšného oplození i po rozmražení (Ricard et al., 2015). Odhalením molekulárních mechanismů probíhajících v průběhu kryoprezervace se může nadále zlepšovat způsob mražení a snižovat tak negativní vliv vznikajícího stresu na schopnost oplození. Proto je velmi důležité se tímto tématem zabývat.

Spermie malých přežvýkavců, tedy i kozlů, jsou oproti ostatním druhům velmi citlivé na výrazné změny teplot. Semenná plazma kozlů obsahuje enzym, který je produkován bulbouretrálními žlázami. Interaguje s vaječným žloutkem a odstředěným mlékem, které se běžně přidávají do extenderu. Jejich reakcí vznikají toxické látky, které poškozují spermie a snižují jejich odolnost vůči kryoprezervaci (Gangwar et al., 2016). Je to enzym EYCE (egg yolk coagulating enzyme, fosfolipáza A2), který funguje jako katalyzátor, který hydrolyzuje lecitin obsažený ve vaječném žloutku na mastné kyseliny a lysolecitin. Tato reakce způsobuje, že se membrána spermie stává více fúzogenní a indukuje tak předčasně akrozomální reakci (Purdy, 2006) a dekonenzaci chromatinu (Sharma a Sood, 2020). Enzym, který reaguje s odstředěným mlékem, BUSgp60 je zodpovědný za hydrolýzu triglyceridů v plazmatické membráně a v mléce, což zapříčiňuje produkci mastných kyselin, které jsou pro spermie toxické (Pellicer-Rubio et al., 1997, Pellicer-Rubio a Combarous, 1998). Možným řešením tohoto problému je odstranění semenné plazmy před kryoprezervací pomocí centrifugace. Ale jejím odstraněním se může snížit kvalita spermatu (Azerêdo et al., 2001). Samotný proces odstranění plazmy může poškodit spermie, pokud je provedeno nesprávně. Je možné přidat do extenderu látky, které minimalizují interakce lipáz. Případně použít extender bez vaječného žloutku nebo mléka (Kundu et al., 2000).

Změny v průběhu kryoprezervace:

Kryoprezervace indukuje zvýšení fluidity a permeability plazmatické membrány, zvýšenou produkci reaktivních forem kyslíku (ROS), porušení integrity akrozomu, narušení

membránového potenciálu v mitochondriích a snižuje pohyblivost spermií. Spermie mohou být skladovány v tekutém dusíku při teplotě - 196 °C neomezenou dobu. Co ale může nepříznivě ovlivnit jejich kvalitu je zamrazování a rozmrazování, částečné rozmrazení a opětovné zamrazení (Khalil et al., 2017, Gürler et al., 2016, Yoon et al., 2015, Prieto-Martínez et al., 2017, Jobim et al., 2004, Ahmad et al., 2014, Dorado et al., 2009).

Změny na plazmatické membráně:

Plazmatická membrána patří mezi struktury, které jsou kryoprezervací ovlivněny jako jedny z prvních (Bailey et al., 2000). U přežvýkavců plazmatická membrána spermie obsahuje velké množství nenasycených fosfolipidů a relativně malé množství cholesterolu, což oslabuje rezistenci vůči změnám teplot (Darin-Bennet a White, 1977). Dochází také k redistribuci fosfolipidů v membráně, některé tvoří gelovitou strukturu místo tekuté mozaiky dříve než ostatní, což vede k fázové separaci lipidů (Grötter et al., 2019). To vede k narušení funkce některých lipid-proteinových interakcí. V průběhu mražení také dochází ke ztrátě nebo přesunutí některých povrchových či membránových proteinů spermie, které pak přicházejí o správnou funkci. Mohou to být proteiny, které jsou důležité pro kapacitaci, interakci, fúzi spermie a oocyty a následného oplození (Wojtusik et al., 2018, Pini et al., 2018a). Proteiny, které se účastní transportu, stabilizace membrány, ochrany proti lipidové peroxidaci a teplotnímu šoku, antiapoptické a dekapacitační proteiny se v průběhu kryoprezervace ztrácejí (Wojtusik et al., 2018, Pini et al., 2018a, He et al., 2016, Westfalewicz et al., 2015). Enzymy s antioxidačním účinkem mohou měnit své zastoupení v plazmatické membráně. Patří mezi ně glutathion peroxidáza, glutathion reductáza a superoxid dismutáza (Marti et al., 2008). Může se jednat o snížení, přesunutí nebo naopak zvýšení jejich počtu (Westfalewicz et al., 2015, Yoon et al., 2016a, Yoon et al., 2016b). Avšak ochrana spermie proti ROS závisí hlavně na semenné plazmě, membrána tomu přispívá pouze málo. Semenná plazma obsahuje jak enzymatické, tak neenzymatické antioxidanty. Jejich účinnost je výrazně omezena po smíchání spermatu s mrazícím médiem v důsledku snížení jejich koncentrace. To vede k nárůstu ROS, což má za následek velké změny v membráně kvůli redukci disulfidických vazeb mezi membránovými proteiny (Chatterjee et al., 2001). ROS také způsobují peroxidaci membránových fosfolipidů a změnu v glykokalyxu spermie (Pini et al., 2018b).

Změny motility spermie:

Oxidativní stres způsobený kryoprezervací narušuje aktivitu mitochondrií, způsobuje efflux intracelulárních enzymů a poškozuje několik proteinů axonemy (dynein, tubulin,

proteiny teplotního šoku). To všechno snižuje pohyblivost spermií. Dochází k narušení fungování elektron transportního řetězce, který je součástí produkce ATP (Aitken, 2017). Mrazení mění zastoupení několika enzymů, které jsou součástí oxidativní fosforylace a glykolýzy, což jsou hlavní zdroje syntézy ATP, to může vést ke snížení motility spermií (Wojtusik et al., 2018, He et al., 2016, Westfalewicz et al., 2015, Yoon et al., 2016a).

Proteiny zapojené do reorganizace cytoskeletu mohou v průběhu mrazení podstoupit oxidativní modifikace (karbonylace) (Mostek et al., 2017).

Změny chromatinu spermií:

V tomto ohledu se názory experimentátorů liší. Některé studie potvrzují skutečnost, že kryoprezervace způsobuje poškození DNA (Khalil et al., 2017, Gürler et al., 2017, Khalifa et al., 2007), v některých studiích odhalují, že nedochází k poškození DNA v průběhu mrazení a rozmrazování, ale až v průběhu následné kultivace (Peris et al., 2004, Kadirvel et al., 2012, Martin et al., 2004). Příčina poškození DNA stále není zcela jasná, ale nejvíce se přisuzuje oxidativnímu a mechanickému stresu (Gürler et al., 2017, Peris et al., 2007).

Spermií dodává do oocyty spolu se svou DNA také několik kódujících a nekódujících molekul RNA, jaderných proteinů a epigenetické značky, které se poté podílejí na vývoji embrya (Yamauchi et al., 2011). Nezávisí tedy pouze na poškození DNA, ale i na zastoupení RNA molekul, nestandardní DNA methylaci a abnormální modifikaci histonů nebo nesprávné kompaktaci DNA ve spermiích, které mohou způsobit chyby v embryogenezi (Kumar et al., 2013, Verma et al., 2014, Ge et al., 2017). Studie DNA integrity je v oblasti umělé inseminace velmi důležitá, protože nedochází k přirozené selekci spermií v reprodukčním traktu samice.

Kryoprezervace také zapříčiňuje abnormální methylační vzory, které buď přímo nebo nepřímo ovlivňují sbalení chromatinu (Miller et al., 2010) a tím pádem ovlivní raný embryonální vývoj (El Hajj et al., 2011).

Nové strategie pro zlepšení uchování spermatu:

Mezi nové způsoby, jak předejít poškození spermatu důsledkem mrazení patří například zvýšení podílu cholesterolu v membráně před zamrazením. To zlepšuje stabilitu membrány a podporuje tak přežití po rozmrazení, pohyblivost, aktivitu mitochondrií, zabraňuje předčasné kapacitaci způsobené mrazem a předčasnou tyrozinovou fosforylací, která spouští akrozomální reakci (Longobardi et al., 2017, Mocé et al., 2010, Salmon et al., 2016).

Poslední dobou se v některých studiích jako složky mrazícího média používají nanočástice s antioxidačními vlastnostmi. Na rozdíl od běžných antioxidantů lépe snášejí nepříznivé podmínky a zůstávají stabilní (Khalil et al., 2019, Shahin et al., 2020, Dashtestani et al., 2019). Mohou být použity zlaté nebo stříbrné nanočástice obsahující selen, oxid zinečnatý a apoferritin. Přínosem těchto nanočástic je podpořená životaschopnost, pohyblivost a integrita chromatinu spermií potvrzená lepší schopností oplození *in vivo* (Khalil et al., 2019). Nanočástice podporují aktivitu antioxidačních enzymů.

Přidáním nemrznoucích proteinů a glykoproteinů do média je membrána chráněna zabráněním tvorby ledových krystalů. Tyto proteiny jsou produkovány některými druhy hmyzu, arktických ryb, koryšů, bakterií, hub a řas (Robles et al., 2019).

Dalším způsobem, jak zamezit tvorbě ledových krystalů je vitifikace. Jedná se o jednoduchou a nenákladnou metodu, která vyžaduje krátkou ekvilibraci před mrazením a velmi rychlé zmrazení v tekutém dusíku (Kumar et al., 2019). Použití této metody by po zdokonalení mohlo být využito hlavně v uchování spermatu divokých a ohrožených druhů, jelikož není potřeba tak náročné vybavení jako u konvenčního mrazení a tato metoda je méně časově náročná.

Složky mrazícího média:

Účelem naředění spermatu v mrazícím médiu neboli extenderu je dodání zdroje energie, ochrana spermií proti teplotnímu šoku a zajištění vhodného prostředí pro jejich dlouhodobé přežití. Mrazící médium se většinou skládá z penetrujících a nepenetrujících kryoprotektiv, pufry, cukrů a dalších látek.

Kryoprotektiva

Kryoprotektiva jsou složky mrazícího média, které brání tvorbě ledových krystalů a chrání spermii před osmotickým a chemickým stresem. Dělí se na penetrující a nepenetrující. Jsou ve většině případů součástí extenderů a většinou je zastoupená kombinace obou typů (Peris-Frau et al., 2020).

Penetrující

Tento typ kryoprotektiv je schopný projít přes plazmatickou membránu a funguje jak intracelulárně, tak extracelulárně. Způsobuje dehydrataci buněk, pomocí osmózy vytlačuje vodu z buňky, také mění fluiditu membrány, což pomáhá spermii přežít kryoprezervaci (Holt, 2000). Dále rozpouští cukry a soli, které jsou složkami extenderu (Gangwar et al., 2016).

Nejčastěji používaný penetrující kryoprotektant je glycerol, dále pak ethylenglykol, dimethylsulfoxid DMSO (Büyükleblebici et al., 2014). Glycerol má při vyšších koncentracích cytotoxický účinek, proto se v extenderech kombinuje s nepenetrujícími kryoprotektivy (nejčastěji s vaječným žloutkem), aby mohl být použit pouze v malé koncentraci (Aboagla a Terada, 2003). Poměr obou druhů kryoprotektiv se zdá být při kryoprezervaci velmi důležitý (Kumar et al. 2018).

Nepenetrující

Tyto kryoprotektanty neprocházejí membránou a fungují tedy pouze extracelulárně. Nejčastěji se používá vaječný žloutek a odstředěné mléko nebo mléčná syrovátka (Pogozhykh et al., 2017).

Antioxidanty

Přidáním antioxidantů do extenderů se snižuje poškození vyvolaného ROS. Antioxidanty mohou být enzymatické nebo neenzymatické. Do extenderů mohou být přidány oba druhy zároveň (Fernández-Santos et al., 2007). Enzymatické antioxidanty jsou například superoxid dismutáza, glutathion reductáza, glutathion peroxidáza, kataláza. Mezi neenzymatické antioxidanty patří redukovaný glutathion, vitamíny, výtažky z rostlin, minerály, aminokyseliny, proteiny a další exogenní látky (Allai et al., 2018, Sánchez-Rubio et al., 2018)

Pufry

Pufry jsou velmi důležitou složkou extenderu, protože velké změny v pH mohou poškodit spermie a také pomáhají při dehydratačním procesu buněk tím, že vytváří osmotické prostředí, tedy zvyšují stabilitu plazmatické membrány spermie a neutralizují kyseliny, které vznikají při uchovávání (Molinia et al., 1996).

Nejčastěji se používá Tris pufir, který je nejpříznivější pro kozlí spermie, avšak u jiných druhů není vždy vhodný. Může mít negativní účinky, jako je zvýšená kapacitace spermií a předčasné vylití akrozomového váčku (Sharma a Sood, 2020).

Cukry

Cukry zajišťují energii pro spermie v mrazícím médiu. Hrají velkou roli v buněčném dýchání, a navíc zajišťují osmotickou rovnováhu a ochranu před teplotním šokem. Mezi cukry používané při kryoprezervaci patří glukóza, laktóza, rafinóza, sacharóza, trehalóza (Büyükleblebici et al., 2014), dextran, fruktóza (Pellicer-Rubio et al., 1997).

Fruktóza a glukóza jsou látky s nízkou molekulární hmotností a mohou tak projít přes plazmatickou membránu spermie. Laktóza, sacharóza, rafinóza, trehalóza a dextran jsou cukry, které nejsou schopné projít plazmatickou membránou. Tyto cukry vytváří osmotický tlak indukující dehydrataci buňky a snižují tak vznik ledových krystalů uvnitř buňky. Také interagují s membránovými fosfolipidy a reorganizují membránu tak, aby spermie lépe přežily kryoprezervaci (Aisen et al., 2002). Na rozdíl od jednoduchých cukrů glukózy a fruktózy, disacharidy slouží hlavně jako kryoprotektanty.

Ostatní složky mrazícího media

Dále se přidávají soli, které slouží jako konzervační prostředek, jako například citrát sodný. Pro konzervaci může být použita i kyselina citronová. Dále se přidávají antibiotika, která předchází kontaminaci vzorku, například penicilin nebo streptomycin. Vitamin C a E mají dobrý vliv na kvalitu spermií po rozmražení, zejména na jejich motilitu, akrozomální a DNA integritu (Sarangi et al., 2017).

2.3.2 Lyofilizace

Existuje možnost, jak uchovávat sperma bez nutnosti skladování vzorků v tekutém dusíku. To výrazně ulehčuje celý proces uchovávání, nemůže dojít ke zničení vzorku kvůli nedostatku dusíku, a to hlavně v důsledku přírodních katastrof, což je u vzácných vzorků velmi přínosné. Jedná se o lyofilizaci neboli sušení mrazem, kdy je vzorek zbaven vody. Takové vzorky lze uchovávat po dlouhou dobu buď ve 4°C nebo i při laboratorní teplotě (Kaneko et al., 2014). Lyofilizace pro mražení spermatu se začala využívat už během 50. let 20. století. (Sherman, 1957). Spermie po lyofilizaci ztrácí motilitu a mají poškozenou membránu. DNA spermie však zůstává víceméně netknutá, netvoří se dvouvláknové zlomy. Pro oplození lyofilizovanými spermii musí být použita metoda, která dopraví spermii až do cytoplazmy oocyty. To umožňuje metoda ICSI, díky níž mohou nepohyblivé spermie oocyt oplodnit a podpořit úspěšný embryonální vývoj, těhotenství a narození živých potomků (Palermo et al., 1992). Poprvé úspěšné oplození až po narození živých potomků lyofilizovanou spermii proběhlo u myši (Wakayama et al., 1998). Narození živých potomků, kdy byly pro oplození použité lyofilizované spermie se dále povedlo u potkana (Kaneko et al., 2012), králíka (Liu et al., 2004), křečka (Muneto et al., 2011) a koně (Choi et al., 2011).

2.4 Poškození DNA spermie

Poškození DNA spermie nemusí být vždy způsobeno kryokonzervací. Změny ve sbalení DNA a její integrity se mohou objevit v jakékoliv fázi vývoje, od zárodečné buňky až po ejakulovanou spermii (González-Marín et al., 2012). Během spermatogeneze jsou poškozené spermie fagocytovány Sertoliho buňkami nebo podstupují programovanou buněčnou smrt bez uvolnění škodlivých látek do okolí (Tesarik et al., 2004), ale mrtvé spermie uvolňují ROS, které mohou negativně ovlivnit okolní spermie.

K poškození DNA může dojít během spermatogeneze. To může být způsobeno nesprávnou maturací chromatinu (Shamsi et al., 2008). V průběhu spermatogeneze dochází k přirozené apoptoze, aby byl zachován adekvátní poměr mezi zárodečnými buňkami a sertolio buňkami (Liu et al., 2008). Koncentrace apoptických buněk může narušit fagocytickou aktivitu sertoliho buněk a nefunkční Fas signalizace může dovést buňkám uniknout apoptóze (abortivní apoptóza) (Sakkas et al., 2003). Aktivace apoptického procesu vede ke vzniku dvouvláknových zlomů DNA, protože jsou aktivovány jaderné endonukleázy a nedokončení procesu dovolí těmto spermii skončit v ejakulátu (González-Marín et al., 2012).

Dále v průběhu spermiogeneze, kdy je většina histonů vyměňována za protaminy a dochází k těsnější kompaktaci chromatinu DNA, zatímco spermie prochází nadvarletem (Kuchakulla et al., 2021). Ve spermii dochází k výměně 85-95 % histonů přes tranzitní proteiny na protaminy (Protamin 1, Protamin 2). Část DNA zůstává sbalená na histonech, to je důležité v raném embryonálním vývoji, při reaktivaci genomu zygoty, pro různé signální dráhy a imprinting genů (Hammoud et al., 2010). Během této výměny dochází k přirozenému vzniku zlomů, které jsou generovány topoizomerázou II, což je endogenní nukleáza aktivní během spermatogeneze (Oliva, 2006). Většina těchto zlomů je opravena při průchodu spermie nadvarletem. Některá místa, kde jsou přítomné zlomy, uniknou opravným mechanismům, a tak se spermie s poškozenou DNA dostanou do ejakulátu. Spermie s poškozenou DNA jsou sice schopné oplodnit oocyt, ale mohou mít negativní následky pro vývoj embrya.

Poškození DNA může také vznikat zvýšenou produkcí ROS s čímž úzce souvisí snížené množství antioxidantů v semenné plazmě a vnější poškození (Shamsi et al., 2010). Volné kyslíkové radikály jsou produkovány v každé spermii, ve zdravé i v poškozené a mohou mít jak pozitivní, tak negativní účinky (Peña et al., 2019). Spolu s antioxidanty udržují vzájemnou rovnováhu. Ke škodlivým účinkům dochází, když podíl ROS předčí množství antioxidantů

(Agarwal et al., 2003). Zvýšené množství ROS a omezený počet antioxidantů může vést k oxidativnímu stresu, který způsobuje poškození jak jaderné, tak mitochondriální DNA, zkracování telomer, změny v epigenetických vzorech a mikrodelece na Y chromozomu (Bui et al., 2018). V kryoprezervovaném spermatu dochází k výraznému vystavení spermií ROS, což ohrožuje správnou kompakci a zhoršuje schopnost oprav jednovláknových i dvouvláknových zlomů, které se během vývoje objevují přirozeně, a to vede k jejich akumulaci (Aitken, 2020). Jednovláknové zlomy vznikají následkem oxidativního stresu a dvouvláknové zlomy vznikají jako nepřímý následek produktů lipidové peroxidace (Badouard et al., 2008).

V ejakulátu je možné nalézt spermie, které jsou poškozené, ale unikly programované buněčné smrti. Tyto spermie jsou sice schopné oplodnit oocyt, ale nejsou schopné podpořit těhotenství, tím pádem dochází k potratu ve velmi časně fázi. Tento fenomén se označuje jako abortivní apoptóza (Sakkas a Alvarez, 2010).

Vzhledem k tomu, že DNA spermie je téměř to jediné, co do oocytu vstupuje, je velmi důležité hodnotit integritu DNA, která pak ovlivňuje nejen fertilizaci ale i následný vývoj embrya (Morris et al., 2002).

Integrita DNA úzce souvisí s morfologickými vlastnostmi spermie. Spermie s abnormální velikostí a tvarem hlavičky vykazují špatnou DNA integritu. Patrný rozdíl je i u nedokonale maturované spermie, kdy jsou v ejakulátu spermie s cytoplazmatickou kapkou (u druhů, pro které není její ponechání typické) (Boe-Hansen et al., 2018).

Během protaminace vznikají jak jednovláknové, tak dvouvláknové zlomy (Aitken a De Iuliis, 2010, Tarozzi et al., 2007), tyto zlomy jsou později ve zdravé spermii opraveny. Pokud nejsou opraveny, mohou vést ke zvýšené fragmentaci DNA v maturovaných i ejakulovaných spermích. DNA poškození neopravené během cesty spermie, uchování v nadvarleti nebo po ejakulaci nemůže být opraveno, protože po spermiogenezi je transkripce a translace omezená (Steger et al., 2011).

2.5 Metody pro hodnocení poškození, integrity DNA spermie

DNA integrita je důležitý faktor, který ovlivňuje funkční kompetenci spermie. Existuje negativní korelace mezi integritou DNA spermie a plodností (Evenson et al., 2006). DNA poškození je spojeno se špatným vývojem embryí, sníženou implantací a malou pravděpodobností těhotenství (Fernández-Gonzalez et al., 2008).

Testy zkoumající míru poškození DNA spermií využívají rozdílné vlastnosti fragmentované a nefragmentované DNA. V některých testech se využívají chromatinové sondy. DNA bez rozvolnění, která je v těsně sbaleném stavu má větší afinitu k interkalačním barvám jako je akridinová oranž, protože redukuje volnou energii napětí. Naopak afinita k interkalaci je velmi malá v rozvolněné DNA a je tím pádem ve fragmentované DNA ztracena. Navázání barev na fosfátové zbytky fragmentované DNA je viditelné, když k interkalaci nedojde. V dalších testech je prováděna denaturace, která odstraňuje nukleární proteiny. Schopnost nabarvení DNA je závislá na sterické struktuře sondy a interakce sondy se substrátem DNA (Ribas-Maynou et al., 2012).

V jádre somatických buněk se DNA poškození běžně určuje posouzením intenzity značení fosforylace γ H2AX. H2AX je varianta histonu, která je rychle fosforylovaná na místech dvouvláknových zlomů. Fosforylace probíhá na serinu 139, označuje zlom a rekrutuje několik reparačních proteinů (Ladstätter et al., 2016).

2.5.1 TUNEL

TUNEL (Terminal deoxy nucleotidyl transferase mediated dUTP nickend labeling assay) test analyzuje přítomnost DNA fragmentace navázáním označených sond na 3'-OH konec (Gupta et al., 2017). Kvantifikuje inkorporaci biotinylovaných dUTP na dvouvláknových zlomech DNA díky reakci katalyzovanou templátem. Test vyhodnocuje buňky s DNA označenou fluorescencí. Může být vyhodnocen jak na světelné, tak fluorescenční mikroskopii a na průtokové cytometrii. Na rozdíl od ISNT, který kvantifikuje pouze jednovláknové zlomy, TUNEL je citlivý jak na jednovláknové, tak dvouvláknové zlomy. TUNEL dobře koreluje s SCSA, kometovým testem a barvením toluidinovou modří. Nevýhodou testu je, že doporučený klinický treshold musí být nižší než u ostatních testů, to je způsobeno tím, že u pevně stočených vláken nedochází k navázání TdT na všechny 3' OH konce, přístupnost je tak omezená, (Tesarik et al., 2006). To se dá vyřešit ošetřením spermií v DTT, což zničí disulfidové můstky mezi protaminy a rozvolní tak chromatin a TdT se může navázat na zlomy uvnitř jádra spermií (Mitchell et al., 2011).

2.5.2 In situ nick translation (ISNT)

Při této metodě se inkorporuje biotinylovaný dUTP do jednovláknových zlomů s templátem (DNA pol I). Měřený parametr je množství fluorescentních spermií, které představují inkorporované dUTP. Je to jednoduchý, ne moc drahý test a na analýzu je potřeba pouze fluorescenční mikroskop. Nevýhodou je, že může kvantifikovat pouze jednovláknové zlomy a má menší citlivost oproti ostatním testům. Čím vyšší stupeň protaminace, tím nižší je efektivita testu, protože závisí na přístupnosti DNA polymerázy I (Manicardi et al., 1995). Dá se ale díky tomu použít i na určení fáze maturace spermie.

2.5.3 SCSA

Tento test je založen na metachromatických vlastnostech akridinové oranže (Evenson et al., 1999). Navázání akridinové oranže na nativní (dvouvláknovou) DNA uvolňuje fluorescenci v zelené vlnové délce, zatímco když se naváže na denaturovanou (jednovláknovou) DNA, emise fluorescence je v oranžovo-červeném spektru. Jedná se o variantu barvení akridinovou oranží s vyhodnocením pomocí průtokového cytometru. Poměr červené fluorescence a celkového počtu buněk udává index DNA fragmentace. Je méně specifický než alkalický kometový test, ISNT nebo TUNEL, protože detekuje jak DNA fragmentaci, tak protaminaci a disulfidické můstky. Může kvantifikovat i nezralé spermie (Virro et al., 2004)

2.5.4 SCD

Metoda SCD je založen na pozorování rozptylu chromatinu (halo), který se tvoří po denuraci (Fernández et al., 2003), Když je DNA poškozená, halo není vidět. Spermie upevněné v agaroze jsou denaturovány a generují jednovláknovou DNA. Spermie následně podstupují lýzu. Spermie s nepoškozenou DNA produkují charakteristické halo, zatímco spermie s fragmentovanou DNA buď halo nemají, nebo je velmi nepatrné. Výhodou je, že k tomuto testu není potřeba fluorescence. Po vložení do agarozy se odstraní protaminy a disulfidové můstky, což částečně uvolní DNA (Shamsi et al., 2011).

2.5.5 Kometový test

Většina testů není schopna rozpoznat rozdíl mezi dvouvláknovými a jednovláknovými zlomy. Kometový test je schopný tento rozdíl rozeznat díky použití alkalické denaturace nebo neutrálního prostředí zároveň (Ribas-Maynou et al., 2012). Fragmentované DNA molekuly jsou separovány elektroforézou a délka ocasu určuje závažnost fragmentace DNA. Označuje se také jako jednobuněčná gelová elektroforéza (SCGE, single cell gel electrophoresis).

Spermie jsou sendvičovány mezi vrstvy agarozy, lyzovány a elektroforovány. Pohyb fragmentované DNA z poškozené spermie je vidět jako ocas komety. Menší DNA fragmenty migrují dál než velké. Intenzita barvení a délka kometového ocasu představují množství migrující DNA, indikující různé stupně fragmentace. K barvení se využívá propidium iodid, SYBR green a YOYO-1. Tato metoda je pracovně náročná, vyhodnocování je subjektivní a vyžaduje zkušenost s posuzováním komet. Na druhou stranu tento test požaduje relativně malé množství spermií (100 buněk) (Lewis et al., 2004)

Alkalická varianta měří jednovláknové i dvouvláknové zlomy, neutrální pouze dvouvláknové. Alkalická varianta ale způsobuje další DNA poškození a výsledky jsou tedy vyšší než ve skutečnosti (Singh et al., 1989).

2.5.6 Barvení akridinovou oranží

Akridinová oranž je fluorescenční barva, interkaluje s DNA a interaguje s ní na základě elektrostatické interakce s RNA nebo jednovláknovou DNA. Když se naváže na dvouvláknovou DNA, emituje v zeleném spektru (emise maximálně 525 nm). Když interaguje s RNA nebo jednovláknovou DNA, emituje v červeném spektru (maximálně 650 nm), tento metachromatický přechod je využit pro kvantifikaci DNA poškození. DNA je při tomto testu denaturována slabou kyselinou. Měřený parametr je množství buněk s červenou fluorescencí, které značí poškozené spermie. Je to rychlá, jednoduchá a levná metoda. Nevýhodou je, že barevný rozdíl není vždy jednoznačný, mohou se vyskytovat přechody mezi zelenou a červenou (Shamsi et al., 2011).

2.5.7 Barvení anilinovou modří

Anilinová modř je acidická barva, která má větší permeabilitu a afinitu pro proteiny v rozvolněném chromatinu v jádře spermie. A to kvůli přítomnosti zbylých histonů a zvýšené přístupnosti bazických skupin nukleoproteinu. Zvýšená intenzita nabarvení spermie anilinovou modří indikuje volné sbalení chromatinu. Tato technika je jednoduchá, levná a k vyhodnocení potřebuje pouze světelný mikroskop. Výsledky anilinového barvení dobře korelují s barvením akridinovou oranží (Erenpreiss et al., 2001).

2.5.8 Barvení chromomycinem A3 (CMA3)

CMA3 je fluorochemicky specifický pro sekvence bohaté na dinukleotid CG a interaguje s DNA na stejném místě, na kterém se váží protaminy. Rozsah barvení je spojen se stupněm protaminace zralé spermie (Bianchi et al., 1993). Vyšší intenzita CMA3 barvení indikuje nedostatek protaminů nebo špatné sbalení chromatinu. K vyhodnocení je potřeba fluorescenční mikroskop. Tento test je levný a jednoduchý.

2.5.9 Barvení Toluidinovou modří

Toluidinová modř barví fosfátové zbytky DNA spermie s volně sbaleným chromatinem a fragmentovanými konci. Když se barva naváže na regiony bohaté na lysin, produkuje fialovo modrou intenzivní barvu, světle modré nabarvení je produkováno interakcí s protaminy v chromatinu. K vyhodnocení může být použit průtokový cytometr. Výsledky korelují s testy SCSA a TUNEL. (Troca-Marín a Geijo-Barrientos, 2010).

2.5.10 Imunofluorescenční barvení proti γ H2AX

Nejnovější test na hodnocení fragmentace DNA spermie je imunodetekce γ H2AX, což je fosforylovaná forma histonu H2AX, která se objevuje krátce po vzniku zlomu na DNA (Valdiglesias et al., 2013). Myší zygoty jsou citlivější na DNA poškození než většina ostatních buněk. Varianta histonu H2AX je ve většině buněčných typů v malém zastoupení, sotva 2 %

z celkové rodiny H2A. Histon H2AX je fosforylován na serinu 139 jako odpověď na poškození DNA (fosforylovaná forma se nazývá γ H2AX) (Redon et al., 2010, Rogakou et al., 1998). V myších zygotách je histon H2AX převládající forma histonů H2A (Nashun et al., 2010), což je důvod, proč jsou myší embrya neobvykle citlivá na DNA poškození, a to i když není indukované (Ziegler-Birling et al., 2009).

Různá míra poškození DNA vytváří různé odpovědi zygoty, některé podstoupí apoptózu během pozdnějších fází vývoje a jiné zastaví vývoj jinými mechanismy než apoptózou (Yamauchi et al., 2007a, Yamauchi et al., 2007b).

Fosforylace H2AX probíhá v savcích zygotách během normálního vývoje bez důkazu DNA poškození (Ziegler-Birling et al., 2009). Možná proto, že H2AX je hlavní varianta H2A v těchto buňkách (Nashun et al., 2010); nicméně samčí prvojádro v zygotě produkované spermii s DNA zlomy má zvýšené množství γ H2AX (Derijck et al., 2006). Nízké množství γ H2AX v normálních buňkách je potřeba pro udržení přesnosti mitotického procesu (McManus a Hendzel, 2005). Důsledkem poškození paternálního prvojádra může dojít k posunutí zahájení replikace. Za normálních okolností v myších zygotách prvojádra zahajují replikaci téměř současně a to mezi 5 a 6 h po oplození (Yamauchi, et al., 2009), poškozené spermie mohou zahájit replikaci až 10 h po oplození (Kafer et al., 2016).

Jednovláknové a dvouvláknové zlomy DNA jsou označeny fosforylací histonu H2AX, tato fosforylace se nazývá γ H2AX. γ H2AX je často používán jako marker DNA zlomů. Místa s navázaným γ H2AX jsou přirozeně přítomny v průběhu demethylace paternálního DNA během reprogramování zygoty (v G1 fázi) (Wossidlo et al., 2010).

Proteinová rodina histonů H2A má největší počet variant. Patří do ní H2A1, H2A2, H2AX a H2AZ a mnoho dalších (Ausió a Abbott, 2002). Varianty se liší pouze v několika zbytcích, ale H2AX protein je unikátní v eukaryotech díky karboxylovému ocasu. Těsně před stop kodonem je ocas v sekvenci vysoce konzervovaný. Obsahuje serin na pozici 139 a jeden glutaminový zbytek na pozici 140, který je známý jako SQ motiv. H2AX není koncentrován na specifickém regionu, ale je náhodně inkorporován do histonů podél DNA.

Stovky až tisíce H2AX proteinů je fosforylováno při vzniku dvouvláknových zlomů (Pilch et al., 2003), fosforylace probíhá v řádech minut po vzniku převážně dvouvláknových, ale i jednovláknových zlomů. Potom, co je H2AX fosforylován, místa s γ H2AX mohou být vizualizována použitím mnoha technik. Tato místa označují akumulaci γ H2AX s dalšími stovkami proteinů, které jsou lokalizovány na místě poškození (Lowndes a Toh, 2005). Po opravě DNA je γ H2AX defosforylována (Chowdhury et al., 2005).

Proti γ H2AX, přesněji proti posledním 9 zbytkům, mezi které patří i fosforylovaný serin 139, lze vyrobit protilátku (Burma et al., 2001). Místa s aktivní γ H2AX jsou běžně detekována a kvantifikována fluorescencí, která zahrnuje barvení primární protilátku proti γ H2AX a fluorescenční sekundární protilátku (Lowndes and Toh, 2005, Huang et al., 2003).

Kromě měření intenzity fluorescence se dá přítomnost protilátky hodnotit také pomocí metody western blot 2D gelovou elektroforézou a pomocí průtokové cytometrie (Burma et al., 2001, Rogakou et al., 1998).

2.6 Vliv poškození DNA na oplození

Vysoký podíl DNA poškození gamet vede k zastavení vývoje. Pokud je DNA poškození spermie pouze v malé míře, vývoj embrya je narušený, embrya vykazují genomickou nestabilitu a pokud se narodí potomek, mohou se u něj objevit různé abnormality. Spermie procházejí v cytoplazmě oocyty morfologickými změnami, tento proces se nazývá remodelace chromatinu. Jádro spermie dekondenzuje, rekondenzuje a nakonec vytvoří samčí prvojádro. Dekondenzace jádra je provázána výměnou histonů za protaminy po tom, co glutathion přítomný v ooplasmě redukuje disulfidové vazby, které spojují protaminy. Dekondenzace chromatinu spermie umožňuje kontakt s enzymy v ooplasmě, které opravují DNA (Middelkamp et al., 2020, Lane et al., 2014).

Jednou z příčin DNA poškození je akumulace reaktivních forem kyslíku (ROS). Ty jsou normálním vedlejším produktem metabolismu. Ve fyziologickém množství hrají důležitou roli jako regulační mediátory v signálních procesech důležitých pro kapacitaci spermie a akrozomální reakci (Droge, 2002). Ve zdravých buňkách, tedy v buňkách, které neprocházejí oxidativním stresem, je koncentrace ROS kontrolována antioxidanty. Ale pokud není regulována, nahromaděná koncentrace ROS může navodit poškození DNA a narušit methylační vzory ve spermii (Aitken and Baker, 2006, Aziz et al., 2004, Tunc a Tremellen, 2009).

Spermie jsou citlivé na oxidativní poškození kvůli malému množství cytoplazmy, která je většinou odstraněna během posledních fází spermiogeneze (Aitken and Fisher, 1994), což snižuje obsah ochranných enzymů (kataláza a glutathion peroxidáza), které se podílejí na ochraně buněk před poškozením způsobeným ROS.

Zvýšená produkce ROS je spojena se zvýšenou mírou poškození DNA ve spermii, což je následně spojeno s horšími výsledky těhotenství (Aitken and Baker, 2006, Aziz et al., 2004) Spermie ošetřené H₂O₂, který zvyšuje hladinu ROS, způsobily horší vývoj embryí a redukovaný růst plodu (Lane et al., 2014).

Ve studii, kde byly použity oocyty a spermie skotu uměle poškozené γ zářením pro *in vitro* oplození bylo zjištěno, že DNA poškození v embryích vede k fragmentaci a náhodné distribuci segmentů paternálních chromozomů do obou sesterských buněk dvoubuněčného embrya. Docházelo k aneuploidii, segmentovým změnám a některé buňky obsahovaly minimum chromozomového obsahu DNA poškození indukuje fragmentaci chromozomů a segregací chyby skrz přímé nerovnoměrné dělení a rýhování, tomu předchází chaotický mozaicismus embrya (Middelkamp et al., 2020).

Fragmentace jaderné DNA může ovlivnit jak jeden, tak oba řetězce DNA šroubovice, mohou tedy vzniknout jednovláknové i dvouvláknové DNA zlomy, může být způsobena defekty v kompaktaci spermie, abortivní apoptózou, oxidativním stresem. Tyto děje jsou úzce propojené, spermie s defektem v kompaktaci chromatinu je náchylnější na oxidativní poškození, které v pozdějším stadiu vývoje spustí apoptózu (Aitken et al., 2013). Dvouvláknové zlomy mají vyšší negativní efekt na výsledky reprodukce než jednovláknové (Reichmann et al., 2018). Protože v zygotě dochází k separaci paternální a maternální DNA do dvou různých prvojader. Není komplementární DNA řetězec pro opravu dvouvláknových zlomů.

3 Cíle práce

1. Zvládnout metodu intracytoplazmatické injekce spermie, včetně přípravy mikromanipulačních pipet, hormonální stimulace myši a izolace oocytů.
2. Aplikovat alternativní metodu hodnocení dlouhodobě uchovávaného spermatu použitím interspecifické ICSI.
3. Provést imunofluorescenční barvení interspecifických zygot ve stadiu PN 5 proti histonu γ H2AX detekující poškození DNA.
4. Vyhodnotit míru poškození DNA paternálního prvojádra u testovaných skupin analýzou intenzity fluorescence.
5. Analyzovat získané výsledky a vyhodnotit rozdíly mezi jednotlivými skupinami spermatu.

4 Materiál a metody

4.1 Přehled použitých organismů, chemikálií a přístrojů

Veškeré experimenty a s nimi související činnosti byly prováděny v laboratořích Oddělení biologie reprodukce Výzkumného ústavu živočišné výroby, v.v.i. v Praze – Uhřetěvesi (dále VÚŽV). Odběr a kryoprezervace spermatu byl proveden v 1. ZAS Chorušice a na ČZU.

4.1.1 Modelové organismy

Pro vypracování diplomové práce byly použity samice myši kmene BDF1 (B6D2F/ctrl, Velaz s.r.o.) ve věku od 6 do 12 týdnů.

Myší oocyty byly vybrány na základě několika kritérií. Neobsahují lipidová granula, a proto struktury, jako jsou prvojádra, která se tvoří po injekci spermie, jsou viditelná pouze pod procházejícím světlem. Pro určení, zda proběhlo oplození, je potřeba pouze světelný mikroskop nebo binolupa. Myší oocyty mají vysoké zastoupení varianty histonu H2AX a jeho zviditelnění fluorescencí je tím pádem dobře detekovatelné. Myši kmene BDF1 jsou běžně používány

k mikromanipulacím díky jejich odolnosti a dobré rozlišitelnosti místa v cytoplazmě, kde se nachází dělicí vřetenko. Toto místo je viditelné díky vysoké polymeraci aktinu a zpevnění cytoplazmy v jeho okolí. Vytváří se zpevněná, vypouklá struktura, která se nachází v blízkosti pólového tělíska (Yoshida and Perry, 2007).

Veškeré experimenty byly vykonány v souladu se Směrnicí Evropského parlamentu a Rady vlády z 22. září 2010 (2010/63/EU) o ochraně zvířat používaných pro vědecké účely a byly schváleny etickou komisí Výzkumného ústavu živočišné výroby, v.v.i. v Praze.

4.1.2 Použité chemikálie

Při pokusech byly použity následující chemikálie:

Chemikálie	Výrobce/dodavatel
Albumin z bovinního séra	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
EmbryoMax KSOM	Millipore, Praha, CZ
Ethanol	P-LAB, Praha, CZ
hCG	Intervet, Boxmeer, The Netherlands
Hyaluronidáza	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
M2 medium	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Minerální olej	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Paraformaldehyd	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
PBS	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Phospho-Histone H2A.X (Ser139) (20E3) Rabbit mAb	Cellsignal, USA
Montovací medium ProLong Gold antifade reagent with DAPI	Invitrogen by Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
PVP	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Rtuť	P-LAB, Praha, CZ
Sekundární protilátka (Alexa Fluor donkey anti rabbit)	Jackson ImmunoResearch, Ely, UK
Sergon (PMSG)	Bioveta, Ivanovice na Hané, CZ
Triton X-100	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA

4.1.3 Roztoky

PBS: pro přípravu roztoku PBS bylo použito 200 ml redestilované vody a jedna tableta PBS.

M2/PVP: pro přípravu roztoku bylo rozpuštěno 1,2 g PVP v 10 ml M2 média.

Roztoky hormonů: roztoky byly připraveny rozpuštěním 1 mg hormonu v 1 ml fyziologického roztoku.

Manipulační medium: roztok byl připraven rozpuštěním BSA v M2 mediu v koncentraci 0,1 % (1 mg BSA na 1 ml M2 média).

PBS/BSA: 1% roztok byl připraven rozpuštěním 50 mg BSA v 5 ml PBS, 3 % roztok byl připraven přidáním 60 mg BSA ke 2 ml PBS.

PBS/Triton: roztok byl připraven naředěním 20 µl tritonu X-100 v 10 ml PBS.

PBS/Paraformaldehyd: 4% roztok byl připraven rozpuštěním 400 mg paraformaldehydu v 10 ml PBS promícháním magnetické míchačky při teplotě 60-70 °C.

Hyaluronidáza: 0,1% roztok byl připraven rozpuštěním 2 mg hyaluronidázy ve 2 ml PBS.

4.1.4 Použité přístroje

Přístroj	Výrobce/dodavatel
CO ₂ inkubátor SANYO	Schoeller, Praha, CZ
Laminární box Steril-Polaris	Unimed, Praha, CZ
Fluorescenční mikroskop Olympus BX51	Olympus, Praha, CZ
Invertovaný mikroskop (Leica DMIL)	Pragolab, Praha, CZ
Lupa Olympus SZX12	Olympus, Praha, CZ
Magnetická míchačka	P-LAB, Praha, CZ
Mikroinjektor (Eppendorf)	Eppendorf, Říčany, CZ
Mikromanipulátor PiezoXpert (Eppendorf)	Eppendorf, Říčany, CZ
Otavovačka kapilár Microforge MF-900	Narishige, Tokyo, Japonsko
Vytahovač kapilár Puller Sutter P97	Sutter Instrument, Novato, USA
Horkovzdušný sterilizátor Ecocell	Labor – Komplet, Praha, CZ

4.1.5 Ostatní materiál

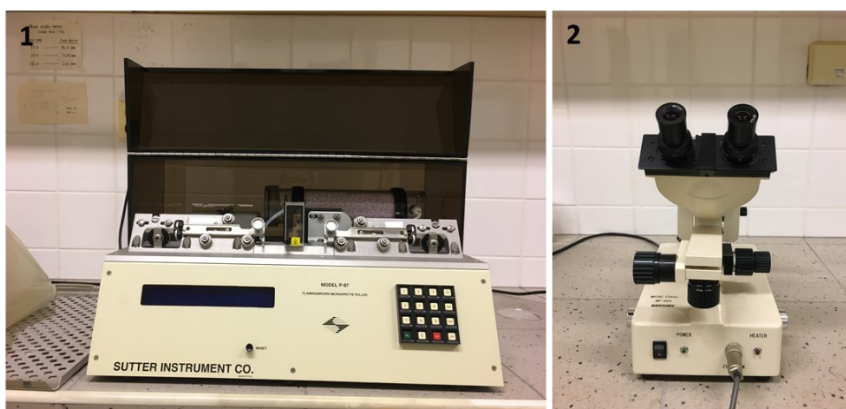
Produkt	Výrobce/dodavatel
Čtyřjamková destička Nunclon	Fisher Scientific, Pardubice, CZ
Chirurgické nástroje	P-LAB, Praha, CZ
Injekční stříkačka Omnican 50	B-Braun, Praha, CZ
Krycí sklo 18x18 mm	P-LAB, Praha, CZ
Parafilm	P-LAB, Praha, CZ
Petriho miska Nunclon 30 mm, 60 mm	Fisher Scientific, Pardubice, CZ
Podložní sklo 76x26 mm	P-LAB, Praha, CZ
Skleněné kapiláry (holdingová)	Harvard Apparatus
Skleněné kapiláry (mikroinjekční)	Harvard Apparatus
Skleněné kapiláry 75 mm/60 μ l	Keraglass, Otovice, CZ

4.2 Metody

4.2.1 Výroba mikromanipulačních pipet

Holdingová pipeta

Skleněná kapilára s vnějším průměrem 1 mm a vnitřním průměrem 0,58 mm byla vytažena na vytahovači kapilár Puller Sutter P97 (Obrázek 1-1) tak, aby vznikl hrot. Poté byl hrot ulomen pomocí brusného papíru. Pomocí otavovačky kapilár Microforge MF-900 (Obrázek 1-2) byl hrot částečně uzavřen, aby byl schopen zachytit oocyt (Obrázek 2). Vnitřní průměr ústí hrotu bylo v rozmezí kolem 10–30 μ m. Hrot pipety byl ohnutý pod úhlem přibližně 15°.



Obrázek 1. Přístroje použité k výrobě mikromanipulačních pipet, 1 – vytahovač kapilár, 2 – otavovačka kapilár

Mikroinjekční pipeta

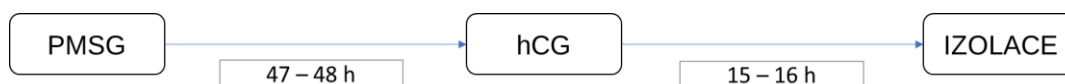
Skleněná kapilára s vnějším průměrem 1 mm a vnitřním průměrem 0,78 mm byla vytažena na vytahovači kapilár Puller Sutter P97 tak, aby vznikl hrot. Poté byl hrot ulomen v místě, kde vnitřní průměr zužující se špičky kapiláry byl mezi 7-10 μm (Obrázek 2) a kapilára byla následně ohnuta v úhlu 15° pomocí otavovačky kapilár Microforge MF-900.



Obrázek 2. Holdingová a mikroinjekční pipeta (převzato z Yoshida and Perry, 2007).

4.2.2 Hormonální stimulace superovulace myši

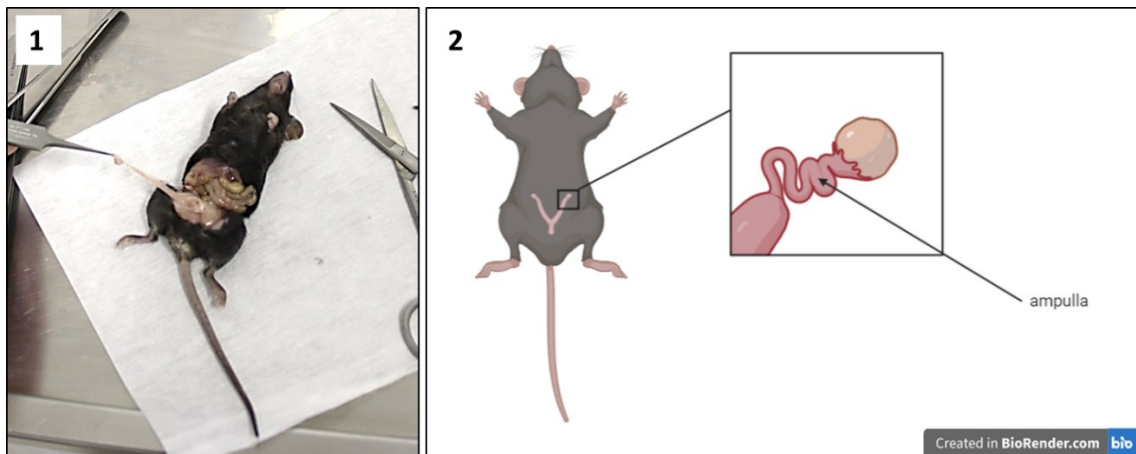
Pro získání maturovaných oocytů (v metafázi II) byla provedena hormonální stimulace myši podle Rychtářové a kol. (2021) s drobnými modifikacemi. Hormonální stimulace byla provedena pomocí intraperitoneální injekce 5 IU PMSG, který napodobuje působení folikuly stimulujícího hormonu a následnou intraperitoneální injekcí 5 IU hCG (lidský chorionový gonadotropin, napodobuje působení luteinizačního hormonu) 47–48 h po podání injekce s PMSG. Hormon PMSG podporuje růst a vývoj folikulu a hCG způsobuje dozrání oocytu a ovulaci. Časové schéma hormonální stimulace je znázorněno na obrázku 3.



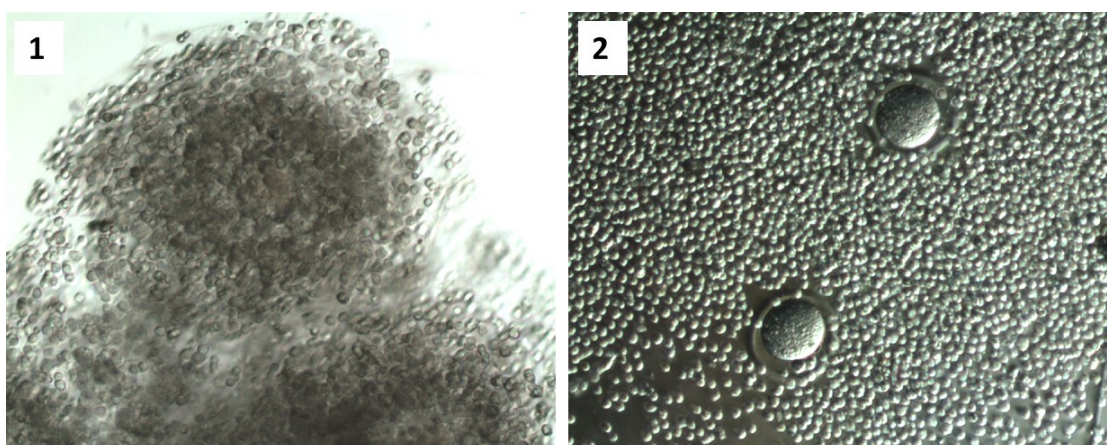
Obrázek 3. Časové schéma hormonální stimulace myši

4.2.3 Izolace oocytů

Samice myši byly usmrceny 15–16 h po injekci hCG a následně jim byly pomocí chirurgické pinzety a nůžek odebrány vaječníky (Obrázek 4-1), které byly ihned vloženy do M2 media o teplotě přibližně 36 °C. Z ampuly vejcovodů (Obrázek 4-2) byl vyjmut kumulo-oocytární komplex, který byl následně v roztoku 0,1% hyaluronidázy opakovaným natahováním a vypouštěním skleněnou kapilárou zbaven kumulárních buněk a rozdělen na jednotlivé oocyty (Obrázek 5). Ty byly posléze vloženy do kultivačního media KSOM ve čtyřjamkové kultivační destičce a umístěny do inkubátoru (37,5 °C, 5 % CO₂, vlhčená atmosféra) do doby mikromanipulace.



Obrázek 4. Fotografie usmrcené myši, pinzetou je uchycen vaječník napojený na vejcovod a roh dělohy (1) a detail ampuly vaječníku (2), schéma vytvořeno pomocí programu BioRender.



Obrázek 5. Myší oocyty izolované z ampuly vejcovodu v roztoku hyaluronidázy, 1 – kumulo-oocytární komplex, 2 – oocyt zbařený kumulárních buněk a uvolněné kumulární buňky, zvětšení 40x.

4.2.4 Spermie

K pokusu byly využívány spermie 3 kozlů plemene koza bílá krátkosrstá, které je uznané jako genetický zdroj. Experimentální dávky byly rozděleny do čtyř skupin podle způsobu zpracování spermií a místa odběru. Skupina C a D pocházela ze stejného kozla. Přehled jednotlivých experimentálních skupin je uveden v tabulce 1.

Tabulka 1. Experimentální skupiny spermatu.

Skupina	Typ	Ředidlo	Způsob odběru	Místo odběru
A	Čerstvé	AndroMed bez glycerolu	umělá vagína	ČZU, Praha
B	Kryoprezervované	AndroMed	umělá vagína	1. ZAS Chorušice
C	Kryoprezervované	AndroMed	elektroejakulace	ČZU, Praha
D	Kryoprezervované	BullXCell	elektroejakulace	ČZU, Praha

4.2.4.1 Čerstvé sperma

Čerstvé sperma kozla (skupina A) bylo použito jako pozitivní kontrola ke skupinám kryoprezervovaného spermatu (skupina B, C a D). Sperma bylo odebráno pomocí umělé vagíny a atrapy. Odběr a naředění spermatu bylo provedeno v odběrové stanici experimentální stáje ČZU v Praze-Suchdole. Sperma bylo odebíráno v rozmezí sezónního reprodukčního období od

září do prosince v letech 2020 a 2021. Ihned po odebrání byl vzorek naředěn v poměru 1:4 v ředidle AndroMed bez přídavku glycerolu. V tomto ředidle bylo sperma převezeno v polystyrenovém boxu do laboratoře a uchováno při 4 °C do druhého dne. Druhý den ráno bylo sperma použito na ICSI. Přibližně jednu hodinu před ICSI bylo 10 µl vzorku resuspendovaného spermatu naředěno v 200 µl M2 média při teplotě přibližně 36 °C. Vzorek byl centrifugován po dobu 5 minut při 4000 rpm. Supernatant byl odsát a část pelety byla odebrána skleněnou kapilárou a resuspendována v kapce M2 media na mikromanipulační misce. Propláchnuté spermie byly použity pro mikromanipulaci.

4.2.4.2 Kryoprezervované sperma

V experimentu byly použity tři skupiny kryoprezervovaných spermií – B, C a D. Pro skupinu B bylo použito ředidlo AndroMed. Po odběru kozla pomocí umělé vagíny a atrapy bylo sperma naředěno v ředidle v poměru 1:4. Následně bylo naplněno do pejet a ekvilibrováno po dobu 2 h při teplotě 5 °C. Poté byly pejety po dobu 8 minut vystaveny parám tekutého dusíku. Na počátku byla teplota -80 °C, po postupném zkracování vzdálenosti vzorku od hladiny tekutého dusíku se po dobu 8 minut teplota klesla na -110 °C. Po tomto kroku byly pejety vloženy do tekutého dusíku (-196 °C). Zmrazené dávky spermatu byly vyrobeny v zemědělském podniku 1. ZAS Chorušice, kde kryoprezervaci prováděl MVDr. Miroslav Hrdlička. Odběr a kryoprezervace spermatu byly provedeny 10.10.2015.

Skupina C a D byla mražena obdobným způsobem, pouze bylo použito odlišné ředidlo. U skupiny C bylo použito ředidlo AndroMed, u skupiny D bylo použito ředidlo BullXCell s přídavkem čerstvého vaječného žloutku v poměru 1:4. Složení jednotlivých médií je uvedeno v tabulce 2. Odběr spermatu byl prováděn elektroejakulací. Obě skupiny spermatu byly naředěny v příslušném ředidle a naplněné do 0,25ml pejet, které byly poté ekvilibrovány na 2 h ve 4 °C. Po ekvilibraci byly pejety zmrazeny v parách tekutého dusíku na stojánku umožňujícím nastavení přesné vzdálenosti od hladiny dusíku. Stojánek byl upevněn na polystyrenovém boxu, který byl naplněn tekutým dusíkem. Mražení probíhalo 20 minut. V první fázi byly pejety 15 cm od hladiny dusíku na 4 minuty. V druhé fázi 9,5 cm nad hladinou dusíku na 5 minut. Ve třetí fázi 5 cm nad hladinou dusíku po dobu 6 minut. Ve čtvrté fázi 1,5 cm nad hladinou dusíku po dobu 8 minut. Zmrazené pejety byly poté skladovány v tekutém dusíku při -196 °C (Ptáček et al., 2019). Tyto dávky spermatu byly vyrobeny na ČZU v Praze

a kryoprezervaci prováděl Ing. Ondřej Šimoník, Ph.D. Odběr a kryoprezervace spermatu byly provedeny 30.10.2010.

Tabulka 2. Složení ředidla AndroMed použité pro skupiny spermatu B a C a BullXCell použité pro skupinu spermatu D, upraveno podle Ptáček et al., 2019.

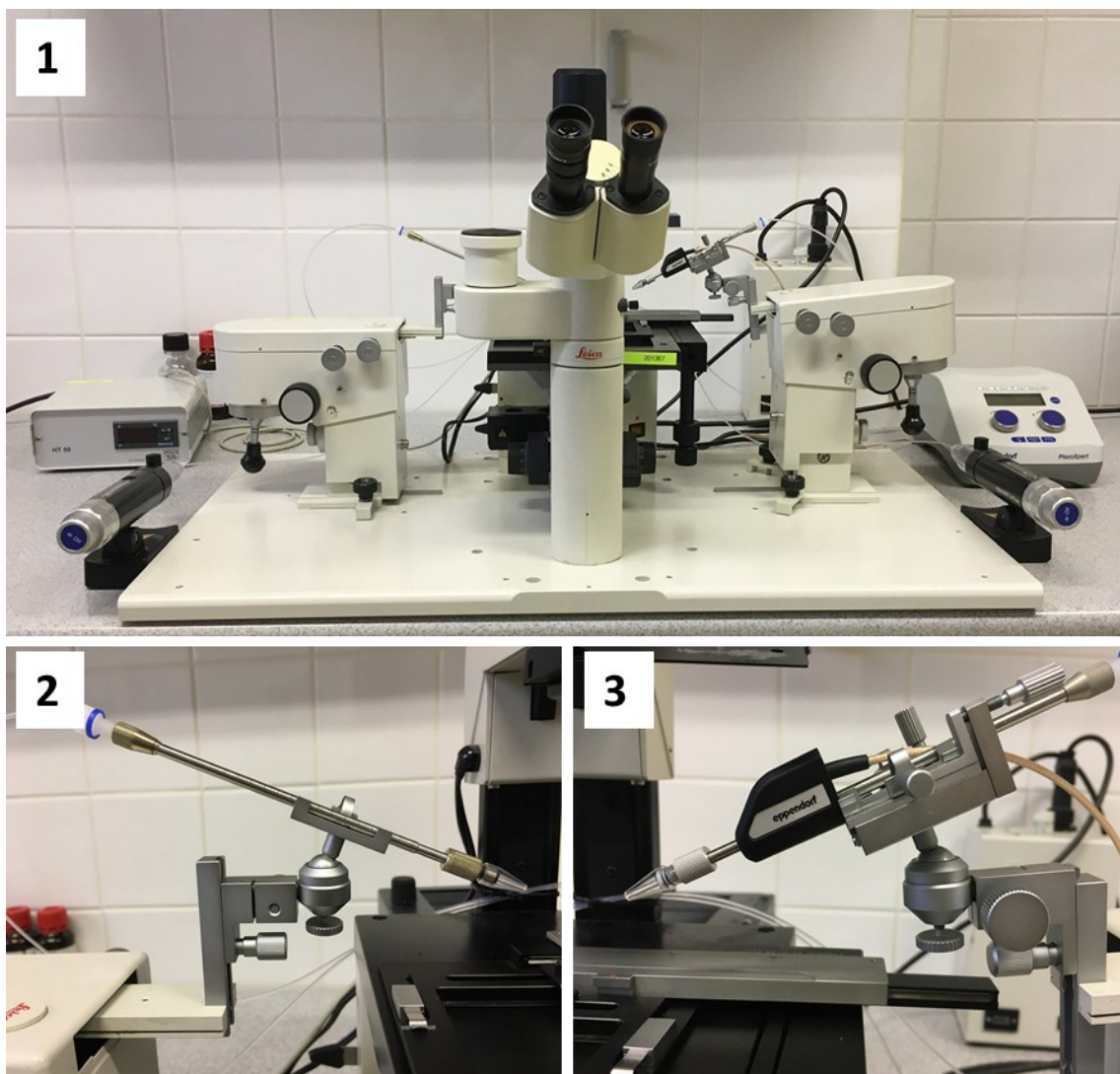
AndroMed	BullXCell
Redestilovaná voda	Redestilovaná voda
Tris pufr	Fosfolipidy
Glycerol	Glycerol
Kyselina citronová	Kyselina citronová
Cukry	Cukry (fruktóza)
Pufry	Pufry
ATB	ATB
	Čerstvý vaječný žloutek 1:4

Před každou ICSI byla část pejety ustržena a vyjmuta z tekutého dusíku a přibližně 10 s byla vystavená laboratorní teplotě. Zbytek pejety byl okamžitě vložen zpět do dusíku, aby nedošlo k rozmrazení zbytku spermatu. Rozmražené sperma bylo posléze přeneseno do 500 µl zkumavky. Z tohoto roztoku bylo odebráno 10 µl a naředěno v 200 µl M2 media o teplotě přibližně 36 °C. Následně bylo stejně jako u kontrolní skupiny sperma centrifugováno, propláchnuto a použito na ICSI.

4.2.5 Mikromanipulace

Piezo ICSI byla provedena s mírnými modifikacemi podle Yoshidy a Perryho (2007). Pro mikromanipulaci byly použity skleněné mikromanipulační pipety. ICSI byla prováděna na invertovaném mikroskopu Leica DMIL, za použití mikromanipulátoru, dvou mikroinjektorů a (Obrázek 5). Regulace nasávání a výtlaku mikromanipulačních pipet byla provedena pomocí hladiny minerálního oleje v mikroinjektoru. Do hrotu mikroinjekční pipety byla přidána rtuť nezbytná pro správnou regulaci intenzity a místa působení piezo signálu. Na mikromanipulační misku byla umístěna kapka mikromanipulačního media pro centrování pipet, několik kapek mikromanipulačního media na proplach oocytů a spermií, čtyři kapky M2 media pro umístění

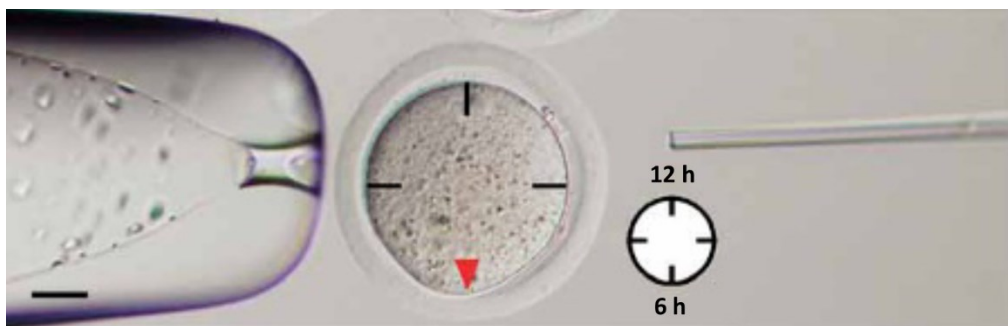
oocytů a pro provedení samotné ICSI a několik kapek PVP/M2 sloužící k proplachování mikroinjekční pipety. PVP je toxická látka, proto je potřeba ji před samotnou injekcí a manipulaci s gametami zcela vypláchnout tak, aby v ústí pipety byla jen rtuť v dostatečné vzdálenosti od okraje a mikromanipulační medium. Kapky byly převrstvené minerálním olejem. Jednotlivé oocyty byly zachyceny lehkým nasátím holdingovou pipetou tak, aby byl oocyt lehce uchopen jak za zona pellucida, tak za cytoplazmatickou membránu, a tím se zabránilo pohybu cytoplazmy při injekci.



Obrázek 5. Přístroje použité k mikromanipulaci. 1 – mikromanipulační sestava – invertovaný mikroskop, mikromanipulátor, mikroinjektory, 2 – mikroinjektor/držák na holdingovou pipetu, 3 – mikroinjektor/držák na mikroinjekční pipetu

ICSI byla prováděna při laboratorní teplotě. Oocyt byl natočen dělicím vřeténkem do pozice 12 nebo 6 hodin (Obrázek 6) tak, aby nedošlo k protnutí této oblasti injekční pipetou a nedošlo k poškození oocytu. Spermie byly zbavené bičíku pomocí mikroinjekční pipety. Tou

byly spermie přitlačeny na dno misky a vertikálními a horizontálními pohyby pipetou byl bičík v oblasti krčku odlomen. Hlavička spermie byla nasáta do mikroinjekční pipety a přenesena k oocytu. Pomocí silnějšího piezo impulsu došlo k narušení zona pellucida. Po proniknutí skrz byla zona pellucida velmi slabým jednorázovým piezo impulzem narušena cytoplazmatická membrána oocytu tak, aby nedošlo k poškození cytoplazmy. Posléze byla hlavička spermie vypuštěna do cytoplazmy oocytu v oblasti blízko uchycení holdingovou pipetou s minimem media. Mikroinjekční pipeta byla jemně vysunuta z oocytu tak, aby nedošlo k jeho poškození. Stejný proces byl zopakován i se zbylými oocyty, které byly následně přesunuty v kultivačním mediu EmbryoMax KSOM do inkubátoru (37,5 °C, 5 % CO₂).



Obrázek 6. Správná poloha oocytu pro injekci. Místo vyztužení kolem dělicího vřeténka (červená šipka) v poloze 6 hodin (převzato z Yoshida a Perry, 2007).

Injikované oocyty byly kultivovány po dobu 8-9 hodin. Po uplynutí této doby, kdy by měly být zygoty ve fázi prvojader PN 5, byly zygoty vyjmuty z kultivačního média a použity k imunofluorescenčnímu barvení. Pro hodnocení intenzity fluorescence histonu γ H2AX byly použity pouze zygoty s prvojádry ve fázi PN 5. Zygoty s prvojádry ve fázi pozdní PN 3 a PN 4 byly z hodnocení vyřazeny. Kultivace zygot probíhala 8-9 hodin po injekci, protože v tomto čase je největší podíl zygot ve fázi prvojader PN 5. Prvojádra v této fázi byla hodnocena kvůli klesajícímu výskytu fyziologicky normálních zlomů DNA způsobených replikací (Wossidlo et al., 2010).

4.2.6 γ H2AX imunofluorescenční barvení

Imunofluorescenční barvení proti γ H2AX bylo s mírnými modifikacemi prováděno podle studie Gawecké a kolektivu (2013). V zygotách byly zviditelněné fragmentace DNA pomocí imunofluorescenčního barvení proti fosforylované formě histonu γ H2AX. Kultivované injikované oocyty byly 8–9 h po injekci fixovány ve 4% paraformaldehydu po dobu 15 minut při laboratorní teplotě. Po fixaci byly permeabilizovány v 0,2% tritonu X-100 po dobu 15 minut při laboratorní teplotě. Dalším krokem byla blokáce v 3% roztoku PBS/BSA po dobu 1 hodiny při laboratorní teplotě. Následně byly injikované oocyty kultivovány v primární protilátce proti γ H2AX ředěné v poměru 1:800 v 1% PBS/BSA přes noc při teplotě 4°C. Následující den byly zygoty 3x propláchnuty v 1% PBS/BSA při laboratorní teplotě a poté byly vloženy do sekundární protilátky ředěné v poměru 1:1000 v 1% PBS/BSA po dobu 1 hodiny při laboratorní teplotě ve tmě. Sekundární protilátka byla opět 3x odmyta v 1% PBS/BSA při laboratorní teplotě. Každý proplach v 1% PBS/BSA trval 20 minut. Následně byly obarvené injikované oocyty přeneseny na podložní sklo a vyhotoveny preparáty s použitím montovacího media s DAPI. Preparáty byly pozorovány pomocí fluorescenčního mikroskopu Olympus BX51. Pro další vyhodnocení byly použity pouze oplozené zygoty se dvěma odlišnými prvojádry.

4.2.7 Vyhodnocení intenzity fluorescence

Intenzita fluorescence γ H2AX byla analyzována pomocí programu ImageJ (National Institutes of Health, USA) u jednotlivých paternálních prvojader. Paternální prvojádra byla od maternálních rozeznána podle velikosti a polohy v závislosti na pólovém tělísku. Byla měřena hodnota Mean Gray Value na 10 místech v oblasti prvojádra pomocí výřezu vždy se stejnými rozměry (50 x 50 pixelů). Následně byly naměřené hodnoty pro každé prvojádro zprůměrovány a byla od nich odečtena hodnota Mean Gray Value naměřená na pozadí, tedy v místě cytoplazmy bez prvojádra. Hodnota Mean Gray Value udává průměrnou hodnotu šedi ve vybraném místě.

4.2.8 Statistická analýza

Naměřené hodnoty intenzity fluorescence jsou prezentovány jako průměr \pm směrodatná odchylka. ICSI pro každou skupinu bylo opakováno alespoň 8x s více než 30 zygotami pro každou skupinu. Statistická analýza byla provedena za použití programu SigmaStat (Systat Software, San Jose, CA, USA). Vícenásobné srovnávací postupy byly provedeny pomocí jednofaktorové analýzy variance, pomocí Student-Newman-Keulsova testu. Hodnota $p < 0,05$ byla považována za signifikantní.

5 Výsledky

5.1 Ovulace myších oocytů

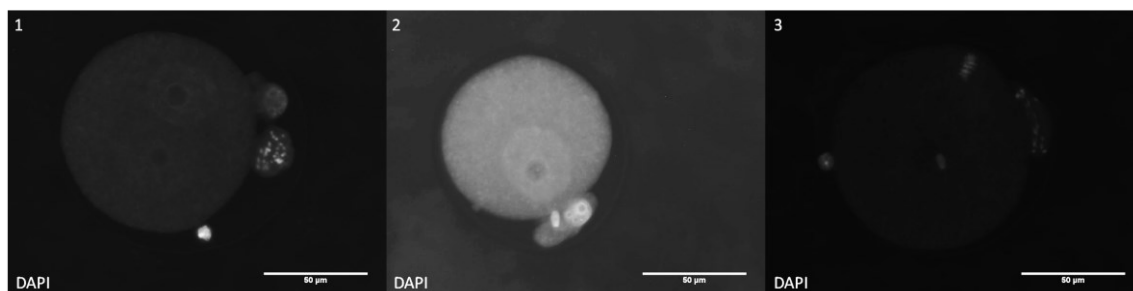
Pro vypracování diplomové práce bylo usmrceno 80 samic myši kmene BDF1. Každá myš po hormonální stimulaci vyprodukovala přibližně 20 maturovaných oocytů. V několika případech myši na hormonální stimulaci nereagovaly správně či vůbec a byl tak izolován pouze malý nebo žádný počet oocytů. Celkem bylo izolováno 847 oocytů. Po izolaci oocytů z ampuly vejcovodu vykazovalo správnou morfologii kolem dvou třetin oocytů ve stadiu metafáze II. Třetina izolovaných oocytů měla špatný počet pólových tělísek (ne právě jedno), svraštěnou cytoplazmu nebo bylo ve stadiu profáze I (pod binolupou viditelný zárodečný váček kolem jádérka a žádné pólové tělísko).

5.2 ICSI

Celkem bylo provedeno 40 ICSI sezení. Z toho 8 pro skupinu A, 14 pro skupinu B, 8 pro skupinu C a 10 pro skupinu D. Na ICSI byly použity pouze morfologicky korektní oocyty v metafázi II, tedy oocyty, které měly vyloučené právě jedno pólové tělísko a viditelnou oblast, kde se nachází metafázní dělicí vřetenko. Cytoplazma je na tomto místě zpevněná aktinem, a proto je mírně vypouklá. Vybrané oocyty měly kompaktní, pravidelně kruhovitý tvar cytoplazmy, která vyplňovala většinu prostoru pod zona pellucida. Zároveň byly na základě

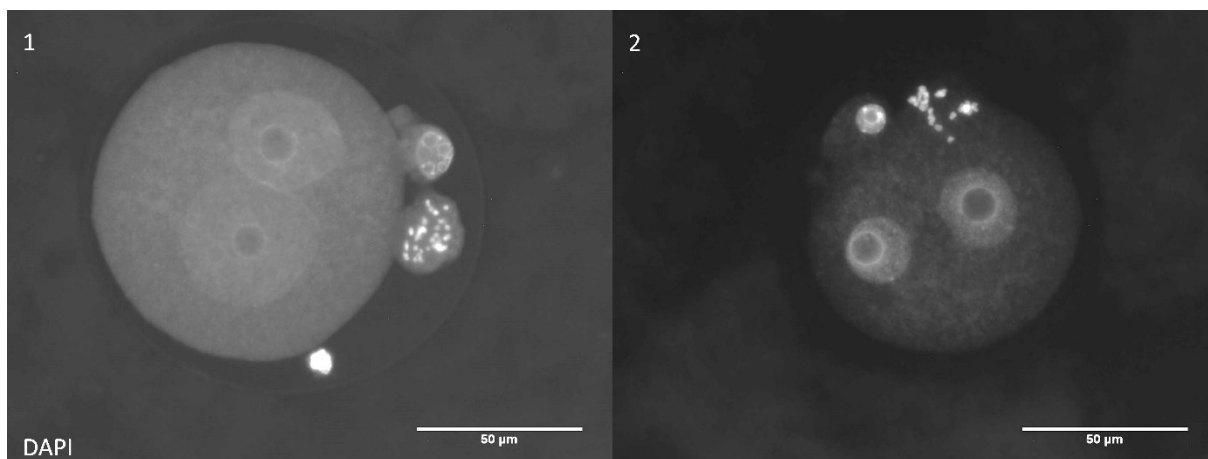
morfoložického hodnocení při ICSI vybrány pouze morfoložicky korektní spermie, tzn, spermie s oválnou hlavičkou, s rovným, nestočeným a neodlomeným bičíkem (v jakékoliv části).

Pro vypracování diplomové práce bylo injikováno celkem 586 oocytů a injekci přežilo 232 oocytů. Z injikovaných oocytů bylo 145 aktivovaných a oplozených (s 2 pólými tělisky a 2 prvojádry; Obrázek 7-1) Zbytek oocytů byl aktivován pouze partenogeneticky (vyvinulo se pouze jedno prvojádro; Obrázek 7-2) nebo zůstalo ve stádiu metafáze II (Obrázek 7-3).



Obrázek 7. Příklady možných výsledků po ICSI, 1 – aktivovaná zygota se dvěma odlišnými prvojádry a dvěma pólými tělisky; 2 – partenogeneticky aktivovaný oocyt, je vytvořeno pouze maternální prvojádro; 3 – injikovaný oocyt ve fázi metafáze II s viditelnými chromozomy seřazenými na metafázní rovině; barveno DAPI, měřítko 50 µm. Jas a kontrast obrázku byl upraven pro lepší viditelnost jednotlivých struktur.

Po kultivaci 8-9 hodin se přibližně 87 % oplozených zygot nacházelo ve stádiu PN 5, zbytek (13 %) byl z následného hodnocení vyřazen (Obrázek 8, Tabulka 3).



Obrázek 8. Zygoty po 8-9 h kultivaci; 1 – zygota ve fázi PN 5; 2 – zygota ve fázi PN 4, barveno DAPI, měřítko 50 µm. Jas a kontrast obrázku byl upraven pro lepší viditelnost jednotlivých struktur.

Tabulka 3. Celkový počet injikovaných oocytů, které přežily mikromanipulaci. Počet a procentuální podíl oocytů, které byly oplozené z celkového počtu injikovaných a přeživších oocytů. Počet a procentuální podíl oplozených zygot ve stadiu PN 5 po kultivaci 8-9 hodin po injekci z celkového počtu zygot.

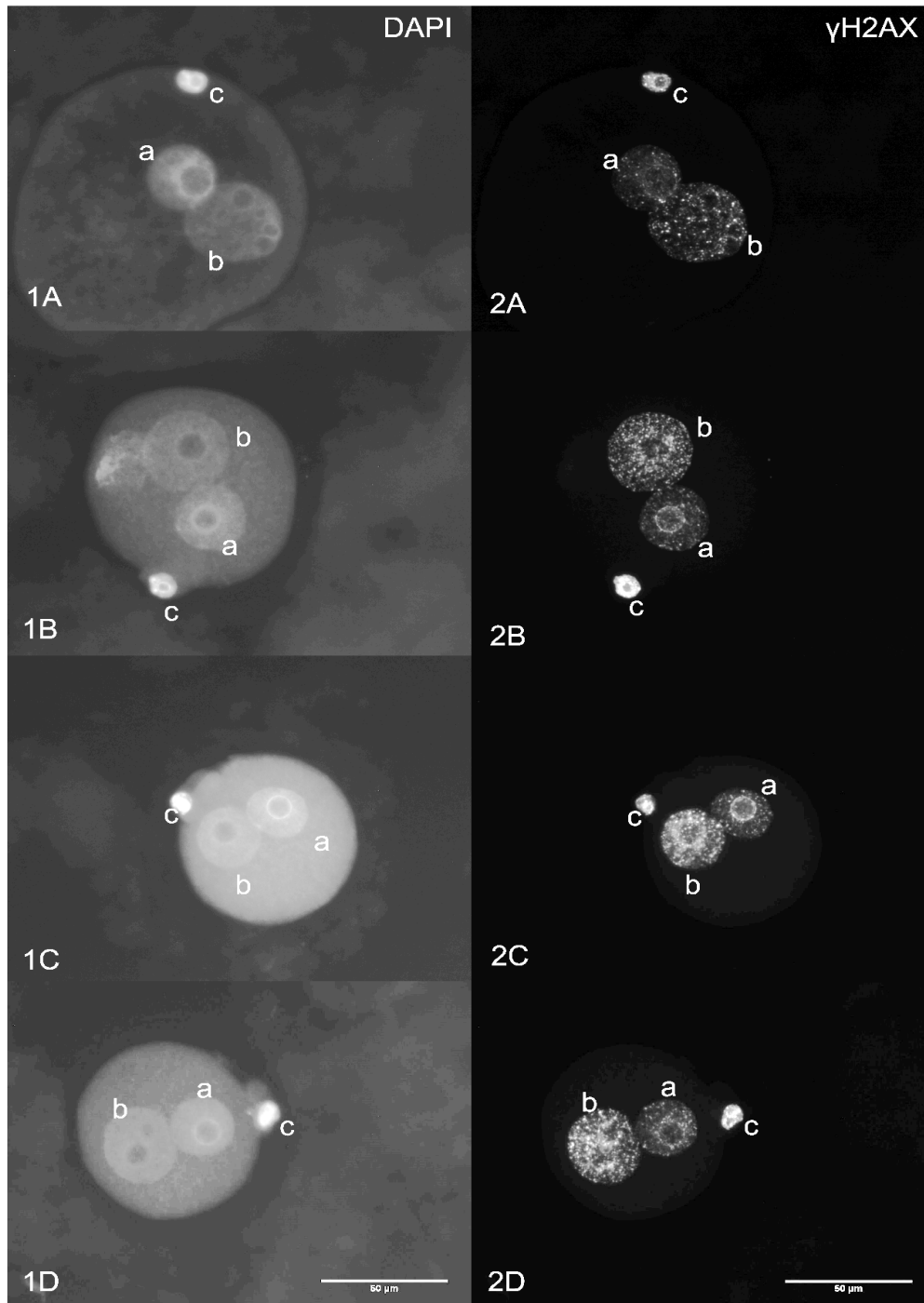
Skupina	Počet injikovaných oocytů	Oplozené s dvěma odlišnými prvojádry	Z toho oplozené zygoty ve fázi PN 5
A	57	38 (67 %)	31 (82 %)
B	62	35 (56 %)	33 (94 %)
C	54	38 (70 %)	32 (84 %)
D	59	34 (58 %)	30 (88 %)

5.3 Hodnocení DNA poškození

U zygot zafixovaných po 8-9 hodinách kultivace bylo hodnoceno DNA poškození v paternálním prvojádře. Pro hodnocení byly vybrány pouze zygoty, které měly prvojádra ve stadiu PN 5. Oocyty s prvojádry ve stadiu PN 4 byly z hodnocení vyřazeny.

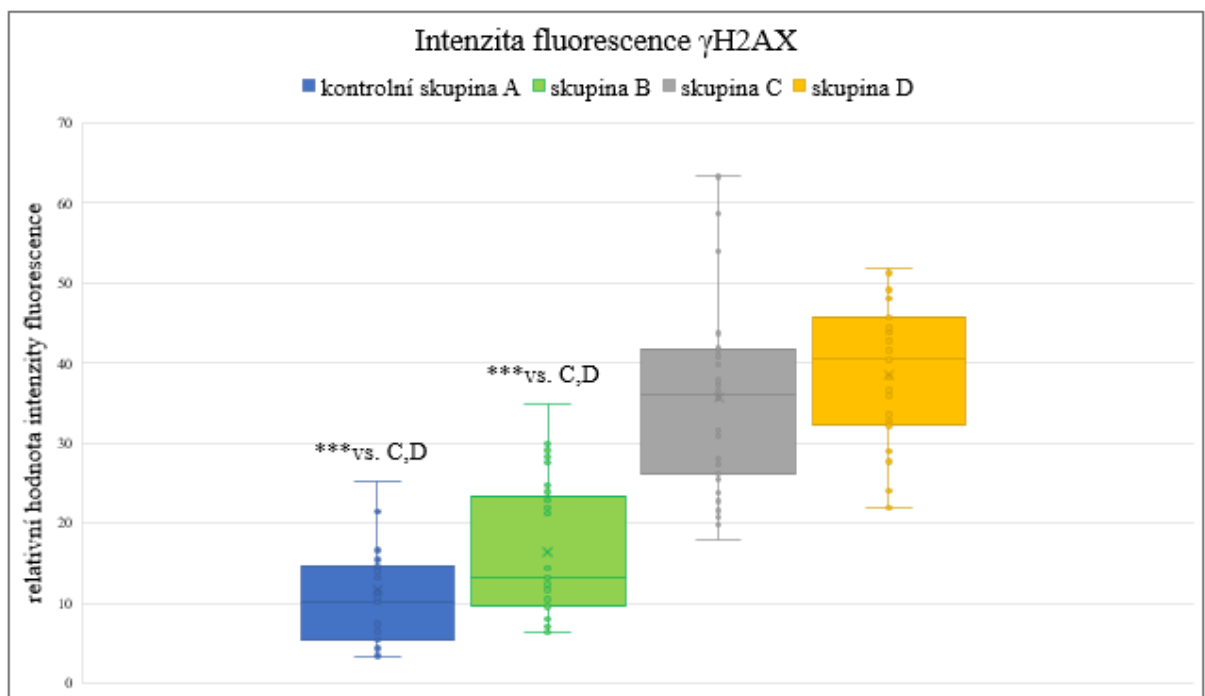
Fluorescence se objevovala jak v paternálním, tak v maternálním prvojádře. V paternálním prvojádře byla fluorescence vždy intenzivnější. V maternálním prvojádře nebyla intenzita fluorescence měřena, ale z hodnocených obrázků byla patrná její nízká intenzita.

Signalizace γ H2AX v prvojádrech byla lokalizována v jednotlivých bodech, nebyla jednotná (Obrázek 9).



Obrázek 9. Zygoty ve stadiu PN 5 po kultivaci 8-9 h. Na obrázcích 1A, 1B, 1C, 1D jsou prvojádra a pólová tělíska znázorněna fluorescencí DAPI. Na obrázcích 2A, 2B, 2C, 2D jsou prvojádra a pólová tělíska viditelná pomocí imunofluorescenčního barvení protilátkou proti fosforylované formě histonu H2AX na Serinu 139 (γ H2AX). 1A, 2A – zygota oplozená spermii ze skupiny A; 1B, 2B – zygota oplozená spermii ze skupiny B; 1C, 2C – zygota oplozená spermii ze skupiny C; 1D, 2D – zygota oplozená spermii ze skupiny D; a – maternální prvojádro, b – paternální prvojádro, c – pólové tělísko. Měřítko 50 μ m. Jas a kontrast obrázku byl upraven pro lepší viditelnost jednotlivých struktur.

Hodnoty intenzity fluorescence paternálního prvojádra se mezi jednotlivými skupinami lišily (Obrázek 10). U kontrolní skupiny (A – čerstvé sperma) byla intenzita poškození DNA měřená intenzitou fluorescence γ H2AX v porovnání se skupinami kryoprezervovaného spermatu nejnižší, statisticky významně odlišná od skupin C a D. Z porovnávaných skupin mraženého spermatu vykazuje nejnižší míru DNA poškození skupina B, která se statisticky významně liší od skupin C a D. Skupina B sice vykazuje zvýšenou míru poškození DNA měřenou intenzitou fluorescence γ H2AX v maternálním prvojádře, tento rozdíl ale nebyl statisticky významný (Obrázek 10).



Obrázek 10. Krabicový graf znázorňující intenzitu fluorescence histonu γ H2AX, *** $p < 0,001$.

Nejvyšší intenzita fluorescence byla naměřena u skupiny D, spermatu kryokonzervovaného pomocí média BullXCell s přidavkem čerstvého vaječného žloutku. Díky vysoké variabilitě výsledků však tento rozdíl není statisticky významně odlišný od skupiny C (Tabulka 4).

Tabulka 4. Hodnoty intenzity fluorescence pro jednotlivé skupiny spermatu.

Skupina	Minimální hodnota	Maximální hodnota	Průměrná hodnota	Směrodatná odchylka	Počet zygot
A	3,43	32,18	11,93	7,44	31
B	6,29	34,86	16,51	8,3	33
C	17,97	63,33	35,63	11,81	32
D	21,94	51,87	39,23	8,06	30

V tabulce 4 jsou uvedeny minimální hodnoty, které představují nejnižší naměřenou hodnotu intenzity fluorescence pro danou skupinu, maximální hodnoty, které představují nejvyšší naměřenou hodnotu intenzity fluorescence pro danou skupinu, průměrné hodnoty, směrodatné odchylky a počet hodnocených zygot v každé skupině.

6 Diskuze

Interspecifická ICSI byla jako metoda pro hodnocení kvality spermatu v minulosti již použita, ale ve většině případů sloužila pouze k prokázání schopnosti spermie oplodnit oocyt. Schopnost oplodnit oocyt byla prokázána vytvořením obou prvojader, samčího i samičího (Kaneko et al., 2014, Moro et al., 2014). V případě použití gamet jedinců podobného živočišného druhu se embryo po iICSI může vyvinout až do stádia blastocysty (Moro et al., 2014). iICSI umožňuje testování genetického materiálu i u druhů s omezenou dostupností biologického materiálu a s omezenou schopností přirozené reprodukce (Wildt et al., 2010). Tvorba a hodnocení prvojader v interspecifických zygotách je dostačující parametr pro hodnocení kvality nejen co se týče integrity DNA řetězce, ale může být využito i k vyšetření karyotypu, kterým lze odhalit různé chromozomové chyby a aberace, k hodnocení integrity jaderné laminy, methylačních vzorů a podobně (Barnetová et al., 2010, Beaujean et al., 2004). iICSI slouží jako vhodný nástroj pro hodnocení dějů po oplození.

Využití myši jako zdroje oocytů pro iICSI je velmi výhodné díky jejich dostupnosti a možnosti hormonální stimulace k docílení ovulace velkého množství oocytů. Ovulované oocyty již není třeba maturovat *in vitro*, protože jsou izolovány již v metafázi II a lze je proto ihned využít pro ICSI. Navíc v myších oocytech a zygotách jsou díky absenci tukových granulí

viditelné struktury i pouze pomocí světelného mikroskopu či binolupy. Kmen myši BDF1 byl zvolen pro vypracování této práce na základě jeho dlouhodobého využívání pro výzkum spojený s mikromanipulacemi. Velkou výhodou kmene myši BDF1 je, že mohou ovulovat výrazně větší množství oocytů (20-30) než hojně využívaný kmen laboratorních myši CD1 (10-15). Navíc oocyty myši kmene BDF1 lépe snášejí mikromanipulaci, díky jejich odolné cytoplazmě. Jejich další výhodou je, že mají viditelnou polohu dělicího vřeténka, což umožňuje správné natočení oocytu při mikromanipulacích tak, aby se mikroinjekční pipeta při vstupu do oocytu vyhnula dělicímu vřeténku a oocyt tak nebyl poškozen a mohl se dále vyvíjet (Yoshida a Perry, 2007).

Ačkoliv myši kmene BDF1 reagují na hormonální stimulaci velmi dobře a od jedné samice lze izolovat až 30 oocytů, v některých případech může dojít k neadekvátní reakci na hormony a může dojít k ovulaci menšího počtu nebo žádných oocytů. K tomu může dojít z několika důvodů, mezi které patří věk, živá hmotnost a zdravotní stav myši, světelný režim v chovném zařízení a množství podávaných hormonů (Behringer et al., 2018). Kromě toho může výsledek ovulace záviset také na správném časovém intervalu podání hormonů a určení správného času usmrcení myši pro izolaci oocytů. Úspěšnost ICSI závisí také na době izolace oocytů a přípravy pracovního prostředí na ICSI tak, aby byly oocyty používané pro ICSI načasované ve správné fázi (metafáze II) a nebyly použity předčasně nebo naopak příliš pozdě. Do přípravy na ICSI lze zahrnout přípravu a zahřátí používaných médií a roztoků na správnou teplotu, seřízení mikromanipulátoru a injekční a holdingové pipety, přípravu spermií a mikromanipulační misky. V některých případech docházelo v důsledku špatně načasované přípravy na ICSI k samovolnému vyloučení druhého pólového tělíska ještě před ICSI nebo byly oocyty naopak izolovány příliš brzy ještě před dosažením potřebné zralosti, kdy nebylo ještě zcela dokončené vyloučení 1. pólového tělíska a tyto oocyty nemohly být k mikromanipulacím použity. Nastavení časového rozložení podávání hormonů a izolace je individuální jak pro jednotlivé laboratoře (Yoshida a Perry, 2007), tak pro jednotlivé pracovníky z jedné laboratoře. Záleží hlavně na zručnosti a rozložení časového plánu konkrétního pracovníka a také na světelném režimu konkrétního zařízení pro chov laboratorních zvířat, který musí být dodržován.

Vzhledem k tomu, že při superovulaci dochází k rekrutování všech oocytů ve vaječníku, ne pouze těch optimálních, jak je tomu při fyziologické ovulaci, nachází se v ampuly vejcovodu po superovulaci i oocyty, které nejsou vhodné pro ICSI (Behringer et al., 2018). Tyto oocyty je nutné vyřadit. Jedná se hlavně o oocyty, které jsou malé, mají svrašťenou cytoplazmu, nepravidelný tvar, porušení integrity zona pellucida a podobně.

Celkem bylo pro vypracování této diplomové práce použito 80 myších samic, ze kterých bylo izolováno celkem 847 oocytů. Z tohoto počtu bylo pro ICSI použito 586 oocytů, které splňovaly parametry oocytů vhodných pro ICSI a které se nacházely v optimálním vývojovém stadiu metafáze II. Injekci přežilo 232 oocytů (40 %), což je výrazně nižší podíl oproti výsledkům ICSI, kterou prováděli již zkušení pracovníci ze stejného pracoviště, kde byla diplomová práce zpracovávána. Úspěšnost přežití myších oocytů injikovaných kozlími spermii byla v jejich případě 93 % (Rychtářová et al., 2021). Metoda ICSI je velmi náročná metoda, která vyžaduje bohaté zkušenosti nejen s touto metodou, ale i s ostatními technikami mikromanipulace. Zvládnutí techniky ICSI není to jediné, co je potřeba k úspěšnému provedení ICSI. Je potřeba vyrobit optimální mikromanipulační pipety, které splňují parametry vhodné pro konkrétní typ gamet, se kterými je ICSI prováděna. Jedná se o správný průměr hrotu pipety, správné ohnutí pipety tak, aby byla dobře použitelná pro nastavení mikromanipulátoru. Je potřeba, aby byl hrot mikroinjekční pipety rovný a pravidelný, aby příliš nenarušil strukturu obalů oocytu, zejména citlivou cytoplazmatickou membránu. Dále je potřeba, aby byl hrot mikromanipulační pipety dostatečně široký pro velikost hlavičky spermie daného druhu a zároveň aby nebyl příliš široký, aby nevznikl moc velký otvor v cytoplazmatické membráně a nedošlo k prasknutí oocytu. Uvádí se, že výsledky přežití oocytů po ICSI s pipetami s hrotem o vnějším průměru 10 μm jsou výrazně nižší (Hiraoka et al., 2015). Pro vyhotovení úspěšné ICSI je dále důležitá zručnost a jemná motorika, která se zlepšuje s opakováním ICSI sezení. V neposlední řadě je ICSI náročná metoda na výdrž mikromanipulátoru. Zatímco zkušenému pracovníkovi může injekce 15 oocytů trvat méně než 10 minut, začínajícím pracovníkům může injekce jednoho oocytu trvat i více než 30 minut (Yoshida a Perry, 2007 a vlastní zkušenost). Pro úspěšné provedení ICSI je velmi důležité správné nastavení mikroskopu, mikromanipulátoru a mikroinjektorů. Samotnému nastavení správné polohy mikromanipulátoru, mikroskopu a pipet musí pracovník věnovat čas před každým ICSI sezením. Po správném seřízení mikromanipulátoru je důležité nastavení správného úhlu mikroinjekční pipety, který svírá se dnem mikromanipulační misky tak, aby se dal pomocí pipety jednoduše oddělit bičík od hlavičky spermie. Dále je důležité, aby injekční i holdingová pipeta byly při injekci spermie ve stejné rovině ostrosti, stejně tak jako oocyt. Injikovaný oocyt by měl být správně natočen tak, aby mikroinjekční pipeta neprocházela skrze dělicí vřetenko a nedošlo tak k jeho poškození. Proto je optimální oocyt natočit výklenkem kolem dělicího vřetenka, který je u myších oocytů kmene BDF1 dobře viditelný, do polohy 12 nebo 6 hodin. Pólové tělíčko, které se nachází v blízkosti dělicího vřetenka, vytváří prostor mezi zona pellucida a cytoplazmatickou membránou. V tomto místě je dobré vniknout mikroinjekční

pipetou přes zona pellucida, protože díky větší vzdálenosti mezi zona pellucida a cytoplazmatickou membránou je menší riziko, že se při protnutí zona pellucida silnějším piezoelektrickým pulzem protne i cytoplazmatická membrána oocyty (Yoshida a Perry, 2007). V tomto případě by došlo k prasknutí membrány a lýze oocyty. K protnutí cytoplazmatické membrány oocyty by mělo dojít až po jejím maximálním napnutí kolem mikroinjekční pipety, aby vzniklý otvor byl co nejmenší a membrána se mohla znovu zacelit. Všechny tyto aspekty pro úspěšnou ICSI musí pracovník dostatečně natrénovat. Trvá dlouhou dobu, než se potřebné návyky pracovníkovi zautomatizují. K lýze oocyty může dojít i následně při kultivaci, a to při vzniku poškození, které oocyt zaregistruje až po nějaké době.

Z celkového počtu oocytů, které přežily ICSI, což bylo 232 oocytů, bylo úspěšně oplozeno 145. To je 62,5 %. To je o více než 10 % méně, než je uváděno ve studii Rychtářové a kol. (2021) z Oddělení biologie reprodukce VÚŽV v.v.i., kde byla úspěšnost oplození myších oocytů kozlími spermii 77 %. Z toho je opět zřejmé, že pro úspěšnou ICSI je potřeba zkušeného pracovníka. V průběhu vypracování této diplomové práce se v mnoha případech (cca 16 %) opakovala skutečnost, že oocyt byly aktivovány partenogeneticky a v oblasti cytoplazmy se nacházela nedekondenzovaná zcela nenarušená hlavička spermie. V tomto případě se spíše než o neschopnost kozlí spermie dekonenzovat v cytoplazmě myšího oocyty jednalo o chybu méně zkušeného mikromanipulátora, kdy zřejmě při vložení spermie do cytoplazmy nebyla správně narušena oolema a spermie tak zůstala v perivitellinním prostoru.

V rámci jednotlivých skupin se úspěšnost oplození lišila pouze mírně. U skupiny A, tj. čerstvého spermatu, byla úspěšnost 67 %, u zmrazeného spermatu skupiny B 56 %, u skupiny C 70 % a u skupiny D 58 %. Nejnižší úspěšnost oplození byla u skupin B a D. Skupina B byla zpracovávána jako první, tudíž nízká úspěšnost oplození by mohla být způsobena i tím, že moje osobní zkušenost s ICSI byla v té době nejnižší. Zároveň měla skupina D nejvyšší míru poškození paternálních prvojader ze všech 4 skupin spermatu. Složkou ředidla byl vaječný žloutek, jehož lecitin reaguje s proteiny semenné plazmy a má nepříznivý vliv na kvalitu spermatu (Gangwar et al., 2016). To může být také důvodem, proč byla úspěšnost oplození nižší než u ostatních skupin. Avšak celkově byla úspěšnost oplození ve srovnání s prací Rychtářové a kol. (2021) velmi nízká. V letních měsících byla úspěšnost ICSI ještě nižší, protože při teplotě nad 30 °C se často stává, že zygoty lyzují. V laboratoři, ve které jsem ICSI prováděla, bohužel nebyla vybavena klimatizací. I přes snahu ochladit stojánek ledem, případně vychladit mikromanipulační misku v lednici, úspěšnost ICSI zůstávala při vyšších teplotách stále nízká.

Pro každou skupinu bylo provedeno několik opakování, aby bylo nasbíráno dostatečné množství zygot. ICSI se skupinou A byla provedena 8x, se skupinou B 14x, se skupinou C 8x a se skupinou D 10x. Skupina B a D měla více opakování kvůli nízké úspěšnosti oplození.

Běžně používané testy na hodnocení kvality spermatu vizualizují zlomy těsně sbalené DNA na protaminech ve velmi kondenzované hlavičce a ukazují poškození, které má spermie ještě před oplozením. Neodhalí ale poškození, které spermie vnáší do zygoty a které je důležité pro embryonální vývoj. Metoda detekce γ H2AX pro hodnocení integrity DNA řetězce spermií je přesnější než konvenčně používané testy. Například detekce zlomů DNA je 100x přesnější než u kometového testu (Ismail et al., 2007). Pro vyhotovení těchto metod je potřeba relativně velké množství spermií (Kumaresan et al., 2020), což může být problém u oligospermických vzorků, případně ohrožených druhů, kde je množství genetického materiálu omezené. Problém testování integrity DNA spočívá v tom, že doposud není možné odlišit poškození, které je pro buňku přirozené a které ne. Tedy rozlišit fyziologické zlomy od patologických. Také nelze určit, jestli jsou tyto zlomy v genech, které jsou aktivní, tedy jestli má toto poškození vliv na další embryonální vývoj. To způsobuje, že výsledky testů ukazují vyšší míru poškození, než ve skutečnosti je. Tento problém se dá vyřešit nastavením hodnot tresholdu DNA poškození (DOI 10.1007/s10815-011-9631-8).

Použití piezo ICSI je citlivější než běžná konvenční metoda ICSI a díky tomu má i vyšší podíl přeživších oocytů po injikaci a lepší úspěšnost oplození než konvenční ICSI (Kimura a Yanagimachi, 1995, Fujii et al., 2020). Navíc díky piezoelektrickým pulzům se při manipulaci se spermii naruší jejich plazmatická membrána a tím se uvolní PLC ζ , jež spouští aktivaci oocytu, který poté zahájí raný embryonální vývoj. Většina spermií navíc prodělává akrozomální reakci při piezo pulzu ještě před tím než se dostane do oocytu a nedojde tak k vylití obsahu akrozomu do cytoplazmy (Yanagida et al., 2001, Anzalone et al., 2016).

Z výsledků této práce vyplívá, že kontrolní skupina čerstvého spermatu, tedy skupina A měla nejmenší podíl DNA poškození, ne však nulové. DNA poškození je v rané zygotě fyziologické (Wossidlo et al., 2010). Navíc i v čerstvém spermatu mohou být poškozené spermie (Sakkas a Alvarez, 2010). U konzervovaného spermatu skupiny B je poškození mírně vyšší než u skupiny kontrolní. Oproti tomu skupina C a D jsou výrazně horší, se statisticky významným rozdílem oproti skupině A i B. Nejvyšší míra poškození byla detekována v paternálních prvojádrech ze skupiny D, kde byl použit vaječný žloutek jako přídavek ředidla. Tento výsledek byl předpokládán, protože lecitin obsažen ve vaječném žloutku negativně reaguje se složkami kozlí semenné plazmy. Nicméně statisticky významný rozdíl byl mezi

skupinami B a C i přesto, že bylo použito stejné ředidlo. Tento výsledek mohlo ovlivnit několik faktorů. Kvalita spermatu se mezi jedinci liší. Bylo použito sperma od celkem 3 kozlů. Jeden kozel byl použit pro skupinu A, druhý pro skupinu B a pro skupinu C a D byl použit třetí kozel. Mezi jednotlivými skupinami se lišila také metoda odběru. Odběr u skupiny A a B byl proveden pomocí umělé vagíny s použitím atrapy. Odběr u skupiny C a D byl proveden elektrostimulací. I to by mohlo mít vliv na kvalitu spermatu. Ve studiích porovnávající tyto dvě metody odběru měla elektroejakulace negativní vliv na kryotoleranci a spermie byly citlivější na změny způsobené výraznými změnami teplot (Jiménez-Rabadán et al., 2016, Jiménez-Rabadán et al., 2012, Guerrero-Gutiérrez et al., 2021). Pro skupinu B byl použit jiný postup mražení než pro skupinu C a D. Všechny skupiny spermatu byly odebírány v reprodukční sezóně kozlů, která trvá přibližně od října do prosince (Ohaneje et al., 2021).

Fluorescence signalizující poškození DNA se objevovala jak u paternálního, tak maternálního prvojádra. U maternálního prvojádra ale byla ve většině případů fluorescence menší než u paternálního. V zygotě je určitá míra zlomů fyziologická, ve fázi, kdy byly zygoty fixované, může probíhat replikace, ve které jsou zlomy DNA generovány při vzniku replikačních vidlic (Wossidlo et al., 2010). Do jisté míry mohla být fluorescence v maternálním prvojádře v některých případech způsobena poškozením oocyty během ICSI.

Uvádí se, že se v současné době naše planeta nachází v 6. nejhorším masovém vymírání za celou dobu její existence. Ubývá jak druhů zvířat žijících ve volné přírodě, tak plemen domácích a hospodářských zvířat, a to zejména historicky významných plemen (Chapin et al., 2000, Wake et al., 2008). Proto je biologický materiál genetických zdrojů uchováván v biobankách po celém světě (Saragusty et al., 2012). Je tedy potřebné, aby se zdokonalovaly metody uchovávání vzácného biologického materiálu, čemuž předchází i výběr efektivních, jednoduchých a přesných metod pro hodnocení jeho kvality.

Zdokonalení technik asistované reprodukce může být přínosné pro ochranu genetických zdrojů, ale důležitý je také program zabývající se přirozenou ochranou chovu zvířat spadajících do kategorie genetických zdrojů a eliminace příčin poklesu jejich biodiverzity (Moisan et al., 2005).

Cílem této práce bylo mj. zjistit, zda existuje rozdíl v intenzitě fluorescence paternálního prvojádra značícího zlomy DNA mezi jednotlivými skupinami spermatu. Pro toto hodnocení byla vybrána relativně jednoduchá metoda analýzy obrazu. Při výběru optimální metody uchovávání spermatu by mohla být použita metoda jako například western blot, aby byla

zjištěna přesnější míra fluorescence. Pro tuto metodu by však bylo potřeba hodnotit více vzorků. Bylo by vhodné se zabývat i jinými parametry kvality spermií než pouze DNA poškození, jako například různé epigenetické značky vnesené do zygoty, methylační vzory a podobně.

7 Souhrn

V České republice ubývají původní plemena hospodářských zvířat zařazená do tzv. genetických zdrojů. Jedná se o plemena hospodářských zvířat, která mají zachované určité kvalitní geny zaručující adaptibilitu na dané podmínky, odolnost vůči nemocem a podobně, a které se šlechtěním a křížením začínají ztrácet. Proto by se mělo řešit udržení genetických zdrojů v populaci a hledat co nejefektivnější způsoby, jak uchovávat jejich biologický materiál. To je důležité i pro ohrožené druhy divokých zvířat, kterých ubývá kvůli lidským činnostem mnohem rapidněji.

Hodnocení kvality spermatu a následný výběr optimálního způsobu uchování biologického materiálu je důležitým aspektem pro zachování reprodukce těchto ohrožených druhů. Hodnocení kvality pomocí interspecifické ICSI výrazně šetří biologický materiál, a to nejen spermie, kterých je pro zhotovení této metody potřeba výrazně méně než u konvenčních testů hodnotících integritu DNA, ale zejména vzácnější biologický materiál, kterým jsou v mnoha případech obtížně získatelné oocyty. Metoda je levná, rychlá a pro zkušeného a schopného mikromanipulátora i jednoduchá.

V porovnání s konvenčními metodami hodnocení kvality spermatu odhaluje tato metoda aspekt, který má reálný vliv na vývoj embryí. Při hodnocení kvality spermií se běžně hodnotí parametry jako je motilita, počet spermií, integrita plazmatické membrány, mitochondrií, integrita DNA a podobně. Míra integrity DNA měřená pomocí konvenčních testů hodnotí míru poškození DNA spermií ještě před oplozením. Naproti tomu metoda používaná v této diplomové práci měří míru poškození DNA až v samčím prvojádře, takže lze pozorovat, jaká míra poškození je reálně vnesena do oocytu a také to, jak je cytoplazma oocytu schopna poškození DNA opravit.

V současné době existuje více způsobů, jak uchovávat biologický materiál. Oocyty mohou být uchovávány pomocí kryoprezervace nebo vitrifikace. Spermie hlavně pomocí kryoprezervace a lyofilizace. Je potřeba určit, jaký způsob konzervace je pro uchování genetického materiálu nejoptimálnější. Na základě získaných výsledků lze odvodit, že metoda měření míry fluorescence γ H2AX v parentálním prvojádře interspecifické zygoty je spolehlivým nástrojem pro toto určení.

Metoda interspecifické ICSI byla schopna odhalit rozdíly v kvalitě DNA spermatu mraženého různými postupy. Získané výsledky potvrdily naše předpoklady definované na základě dostupných informací z literatury.

8 Seznam použité literatury

Aboagla, E.M. and Terada, T. (2003) Trehalose-enhanced fluidity of the goat sperm membrane and its protection during freezing. *Biol Reprod* 69:1245-1250.

Agarwal, A., Saleh, R.A. and Bedaiwy, M.A. (2003) Role of reactive oxygen species in the pathophysiology of human reproduction. *Fertil Steril* 79:829-843.

Ahmad, M., Nasrullah, R., Riaz, H., Sattar, A. and Ahmad, N. (2014) Changes in motility, morphology, plasma membrane and acrosome integrity during stages of cryopreservation of buck sperm. *J S Afr Vet Assoc.* 2014 Feb 28;85(1):972.

Aisen, E.G., Medina, V.H. and Venturino, A. (2002) Cryopreservation and post-thawed fertility of ram semen frozen in different trehalose concentrations. *Theriogenology* 57:1801-1808.

Aitken RJ, Bronson R, Smith TB, De Iuliis GN. (2013) The source and significance of DNA damage in human spermatozoa; a commentary on diagnostic strategies and straw man fallacies. *Mol Hum Reprod.* 9(8):475-85.

Aitken, J. and Fisher, H. (1994) Reactive oxygen species generation and human spermatozoa: the balance of benefit and risk. *Bioessays* 16:259-267.

Aitken, R.J. (2017) Reactive oxygen species as mediators of sperm capacitation and pathological damage. *Mol Reprod Dev* 84:1039–1052.

Aitken, R.J. (2020) Impact of oxidative stress on male and female germ cells: implications for fertility. *Reproduction* 159:189-201.

Aitken, R.J. and Baker, M.A. (2006) Oxidative stress, sperm survival and fertility control. *Mol Cell Endocrinol* 250:66-69.

Aitken, R.J. and De Iuliis, G.N. (2010) On the possible origins of DNA damage in human spermatozoa. *Mol Hum Reprod* 16:3-13.

Alberio, R., Zakhartchenko, V., Motlik, J. and Wolf, E. (2001) Mammalian oocyte activation: lessons from the sperm and implications for nuclear transfer. *Int J Dev Biol* 45:797-809.

Albertini, D.F. (2015) What case reports can and cannot reveal. *J Assist Reprod Genet* 32:1297-1298.

Allai, L., Benmoula, A., Marciane da Silva, M., Nasser, B. and El Amiri, B. (2018) Supplementation of ram semen extender to improve seminal quality and fertility rate. *Anim Reprod Sci* 192:6-17.

Amidi., F, Pazhohan, A., Shabani Nashtaei, M., Khodarahmian, M. and Nekoonam, S. (2016) The role of antioxidants in sperm freezing: a review. *Cell Tissue Bank* 17:745-756.

Andrabi, S.M. and Maxwell, W.M. (2007) A review on reproductive biotechnologies for conservation of endangered mammalian species. *Anim Reprod Sci* 99:223-243.

Anifandis, G., Messini, C.I., Dafopoulos, K., Daponte, A. and Messinis, I.E. (2016) Sperm contributions to oocyte activation: more that meets the eye. *J Assist Reprod Genet* 33:313-316.

Anzalone, D.A., Iuso, D., Czernik, M., Ptak, G. and Loi, P. (2016) Plasma membrane and acrosome loss before ICSI is required for sheep embryonic development. *J Assist Reprod Genet* 33:757-763.

Argov-Argaman, N., Mahgrefthe, K., Zeron, Y. and Roth, Z. (2013) Season-induced variation in lipid composition is associated with semen quality in Holstein bulls. *Reproduction* 145:479-489.

- Arias, M.E., Risopatrón, J., Sánchez, R. and Felmer, R. (2015) Intracytoplasmic sperm injection affects embryo developmental potential and gene expression in cattle. *Reprod Biol* 15:34-41.
- Ausió, J. and Abbott, D.W. (2002) The many tales of a tail: carboxyl-terminal tail heterogeneity specializes histone H2A variants for defined chromatin function. *Biochemistry* 41:5945-5949.
- Azerêdo, G.A., Esper C.R. and Resende, K.T. (2001) Evaluation of plasma membrane integrity of frozen-thawed goat spermatozoa with or without seminal plasma. *Small Ruminant Research* 41:257-263.
- Aziz, N., Saleh, R.A., Sharma, R.K., Lewis-Jones, I., Esfandiari, N., Thomas, A.J. Jr. and Agarwal, A. (2004) Novel association between sperm reactive oxygen species production, sperm morphological defects, and the sperm deformity index. *Fertil Steril* 81:349-354.
- Badouard, C., Ménézo, Y., Panteix, G., Ravanat, J.L., Douki, T., Cadet, J. and Favier, A. (2008) Determination of new types of DNA lesions in human sperm. *Zygote* 16:9-13.
- Bailey, J., Morrier, A. and Cormier, N. (2003) Semen cryopreservation: Successes and persistent problems in farm species. *Can. J. Anim. Sci.* 83:393-401.
- Bailey, J.L., Bilodeau, J.F. and Cormier, N. (2000) Semen cryopreservation in domestic animals: a damaging and capacitating phenomenon. *J Androl* 21(1):1-7.
- Barnetova, I., Fulka, H., Fulka, J. Jr. (2010) Epigenetic characteristics of paternal chromatin in interspecies zygotes. *J Reprod Dev.* 56(6):601-6.
- Beaujean, N., Taylor, J.E., McGarry, M., Gardner, J.O., Wilmut, I., Loi, P., Ptak, G., Galli, C., Lazzari, G., Bird, A., Young, L.E., Meehan, R.R. (2004) The effect of interspecific oocytes on demethylation of sperm DNA. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101(20):7636-40.
- Behringer, R., Gertsenstein, M., Nagy, K.V., Nagy, A. (2018) Administration of Gonadotropins for Superovulation in Mice. *Cold Spring Harb Protoc.* 2;2018(1).
- Bianchi, P.G., Manicardi, G.C., Bizzaro, D., Bianchi, U. and Sakkas, D. (1993) Effect of deoxyribonucleic acid protamination on fluorochrome staining and in situ nick-translation of murine and human mature spermatozoa. *Biol Reprod* 49:1083-1088.
- Boe-Hansen, G.B., Fortes, M.R.S. and Satake, N. (2018) Morphological defects, sperm DNA integrity, and protamination of bovine spermatozoa. *Andrology* 6:627-633.
- Bui, A.D., Sharma, R., Henkel, R. and Agarwal, A. (2018) Reactive oxygen species impact on sperm DNA and its role in male infertility. *Andrologia* 50:e13012.
- Burma, S., Chen, B.P., Murphy, M., Kurimasa, A. and Chen DJ. (2001) ATM phosphorylates histone H2AX in response to DNA double-strand breaks. *J Biol Chem* 276:42462-42467.
- Büyükblebici, S. Pürhan Barbaros Tuncer, P.B., Taşdemir, U. and Büyükblebici, O. (2014) The Comparison of Three Different Cryoprotectants in Cryopreservation of Angora Goat Semen. *Kafkas Univ Vet Fak Derg* 20:613-619.
- Catalá, M.G., Izquierdo, D., Rodríguez-Prado, M., Hammami, S. and Paramio, M.T. (2012) Effect of oocyte quality on blastocyst development after in vitro fertilization (IVF) and intracytoplasmic sperm injection (ICSI) in a sheep model. *Fertil Steril* 97:1004-1008.
- Comizzoli, P. and Holt, W.V. (2019) Breakthroughs and new horizons in reproductive biology of rare and endangered animal species. *Biol Reprod* 101:514-525.
- Consequences of changing biodiversity. *Nature.*;405:234-42.
- Darin-Bennett, A. and White, I.G. (1977) Influence of the cholesterol content of mammalian spermatozoa on susceptibility to cold-shock. *Cryobiology* 14:466-470.
- Dashtestani, F., Ghourchian, H. and Najafi, A. (2019) Silver-gold-apoferritin nanozyme for suppressing oxidative stress during cryopreservation. *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl* 94:831-840.
- De Rensis, F. and Scaramuzzi, R.J. (2003) Heat stress and seasonal effects on reproduction in the dairy cow--a review. *Theriogenology* 60:1139-1151.

- Derijck, A.A., van der Heijden, G.W., Giele, M., Philippens, M.E., van Bavel, C.C. and de Boer, P. (2006) gammaH2AX signalling during sperm chromatin remodelling in the mouse zygote. *DNA Repair* 5:959-971.
- Domínguez, M.P., Falcinelli, A., Hozbor, F., Sánchez, E., Cesari, A. and Alberio, R.H. (2008) Seasonal variations in the composition of ram seminal plasma and its effect on frozen-thawed ram sperm. *Theriogenology* 69:564-573.
- Dorado, J., Hidalgo, M., Muñoz, A., and Rodríguez, I. (2009) Assessment of goat semen freezability according to the spermatozoa characteristics from fresh and frozen samples. *Anim Reprod Sci* 112:150-157.
- Dröge, W. (2002) Free radicals in the physiological control of cell function. *Physiol Rev* 82:47-95.
- El Hajj, N., Zechner, U., Schneider, E., Tresch, A., Gromoll, J., Hahn, T., Schorsch, M. and Haaf T. (2011) Methylation status of imprinted genes and repetitive elements in sperm DNA from infertile males. *Sex Dev* 5:60-69.
- Erenpreiss, J., Bars, J., Lipatnikova, V., Erenpreisa, J. and Zalkalns, J. (2001) Comparative study of cytochemical tests for sperm chromatin integrity. *J Androl* 22:45-53.
- Evenson, D., & Wixon, R. (2006). Meta-analysis of sperm DNA fragmentation using the sperm chromatin structure assay. *Reproductive biomedicine online*, 12(4), 466–472.
- Evenson, D.P., Jost, L.K., Marshall, D., Zinaman, M.J., Clegg, E., Purvis, K., de Angelis, P. and Claussen, O.P. (1999) Utility of the sperm chromatin structure assay as a diagnostic and prognostic tool in the human fertility clinic. *Hum Reprod* 14:1039-1049.
- Ezzati, M., Shanehbandi, D., Hamdi, K., Rahbar, S. and Pashaiasl, M. (2020) Influence of cryopreservation on structure and function of mammalian spermatozoa: an overview. *Cell Tissue Bank* 21:1-15.
- Fernández, J.L., Muriel, L., Rivero, M.T., Goyanes, V., Vazquez, R. and Alvarez, J.G. (2003) The sperm chromatin dispersion test: a simple method for the determination of sperm DNA fragmentation. *J Androl* 24:59-66.
- Fernandez-Gonzalez, L., Hribal, R., Stagegaard, J., Zahmel, J. and Jewgenow, K. (2015) Production of lion (*Panthera leo*) blastocysts after in vitro maturation of oocytes and intracytoplasmic sperm injection. *Theriogenology* 83:995-999.
- Fernández-Gonzalez, R., Moreira, P. N., Pérez-Crespo, M., Sánchez-Martín, M., Ramirez, M. A., Pericuesta, E., Bilbao, A., Bermejo-Alvarez, P., de Dios Hourcade, J., de Fonseca, F. R., & Gutiérrez-Adán, A. (2008). Long-term effects of mouse intracytoplasmic sperm injection with DNA-fragmented sperm on health and behavior of adult offspring. *Biology of reproduction*, 78(4), 761–772..
- Fernández-Santos, M.R., Martínez-Pastor, F., García-Macías, V., Estesó, M.C., Soler, A.J., Paz, P., Anel, L. and Garde, J.J. (2007) Sperm characteristics and DNA integrity of Iberian red deer (*Cervus elaphus hispanicus*) epididymal spermatozoa frozen in the presence of enzymatic and nonenzymatic antioxidants. *J Androl* 28:294-305.
- Fujii, Y., Endo, Y., Mitsuhashi, S., Hayashi, M. and Motoyama, H. (2020) Evaluation of the effect of piezo-intracytoplasmic sperm injection on the laboratory, clinical, and neonatal outcomes. *Reprod Med Biol* 19:198-205.
- Furuhashi, K., Saeki, Y., Enatsu, N., Iwasaki, T., Ito, K., Mizusawa, Y., Matsumoto, Y., Kokeguchi, S. and Shiotani, M. (2019) Piezo-assisted ICSI improves fertilization and blastocyst development rates compared with conventional ICSI in women aged more than 35 years. *Reprod Med Biol* 18:357-361.
- Gangwar, C., Kharche, S.D., Kumar, S. and Jindal, S.K. (2016) Cryopreservation of goat semen: status and prospects. *Indian Journal of Small Ruminants* 22: 1-10.
- García-Vázquez, F.A., Ruiz, S., Matás, C., Izquierdo-Rico, M.J., Grullón, L.A. et al. (2010) Production of transgenic piglets using ICSI-sperm-mediated gene transfer in combination with recombinase RecA. *Reproduction* 140:259-272.
- Gawecka, J.E., Marh, J., Ortega, M., Yamauchi, Y., Ward, M.A. and Ward, W.S. (2013) Mouse zygotes respond to severe sperm DNA damage by delaying paternal DNA replication and embryonic development. *PLoS One* 8:e56385.

- Ge, S.Q., Lin, S.L., Zhao, Z.H. and Sun, Q.Y. (2017) Epigenetic dynamics and interplay during spermatogenesis and embryogenesis: implications for male fertility and offspring health. *Oncotarget* 8:53804-53818.
- González-Marín, C., Gosálvez, J. and Roy, R. (2012) Types, causes, detection and repair of DNA fragmentation in animal and human sperm cells. *Int J Mol Sci* 13:14026-14052.
- González-Marín, C., Gosálvez, J., & Roy, R. (2012). Types, causes, detection and repair of DNA fragmentation in animal and human sperm cells. *International journal of molecular sciences*, 13(11), 14026–14052.
- Grötter, L.G., Cattaneo, L., Marini, P.E., Kjelland, M.E. and Ferré, L.B. (2019) Recent advances in bovine sperm cryopreservation techniques with a focus on sperm post-thaw quality optimization. *Reprod Domest Anim* 54:655-665.
- Guerrero-Gutiérrez M, Ungerfeld R, Kako Rodríguez MG, Santiago-Moreno J, Giriboni J. (2021) Using transrectal ultrasound-guided massage of the accessory sex glands for buck semen collection yields semen with greater cryoresistance than electroejaculation alone during the breeding season. *Theriogenology*. 15;172:142-149.
- Gupta, S., Sharma, R. and Agarwal, A. (2017) Inter-and Intra-Laboratory Standardization of TUNEL Assay for Assessment of Sperm DNA Fragmentation. *Curr Protoc Toxicol* 74:16.11.1-16.11.22.
- Gürler, H., Malama, E., Heppelmann, M, Calisici, O., Leiding, C., Kastelic, J.P. and Bollwein, H. (2016) Effects of cryopreservation on sperm viability, synthesis of reactive oxygen species, and DNA damage of bovine sperm. *Theriogenology* 86:562-571.
- Hammoud, S.S., Purwar, J., Pflueger, C., Cairns, B.R. and Carrell, D.T. (2010) Alterations in sperm DNA methylation patterns at imprinted loci in two classes of infertility. *Fertil Steril* 94:1728-1733.
- He, Y., Wang, K., Zhao, X., Zhang, Y., Ma, Y. and Hu, J. (2016) Differential proteome association study of freeze-thaw damage in ram sperm. *Cryobiology* 72:60-68.
- Hiraoka, K. and Kitamura, S. (2015) Clinical efficiency of Piezo-ICSI using micropipettes with a wall thickness of 0.625 μm . *J Assist Reprod Genet* 32:1827-1833.
- Holt, W.V. (2000) Basic aspects of frozen storage of semen. *Anim Reprod Sci* 62:3-22.
- Holt, W.V., Brown, J.L. and Comizzoli, P. (2014) Reproductive science as an essential component of conservation biology. *Adv Exp Med Biol* 753:3-14.
- Huang, X., Traganos, F. and Darzynkiewicz, Z. (2003) DNA damage induced by DNA topoisomerase I- and topoisomerase II-inhibitors detected by histone H2AX phosphorylation in relation to the cell cycle phase and apoptosis. *Cell Cycle* 2:614-619.
- Chapin FSI, Zavaleta ES, Eviner VT, Naylor RL, Vitousek PM, Reynolds HL, et al. (2000)
- Chatterjee, S., de Lamirande, E. and Gagnon, C. (2001) Cryopreservation alters membrane sulfhydryl status of bull spermatozoa: protection by oxidized glutathione. *Mol Reprod Dev* 60:498-506.
- Choi YH, Varner DD, Love CC, Hartman DL, Hinrichs K. (2011) Production of live foal after intracytoplasmic injection of lyophilized sperm and sperm extract in the horse.
- Choi, Y.H., Velez, I.C., Macías-García, B., Riera, F.L., Ballard, C.S. and Hinrichs, K. (2016) Effect of clinically-related factors on in vitro blastocyst development after equine ICSI. *Theriogenology* 85:1289-1296.
- Chowdhury, D., Keogh, M.C., Ishii, H., Peterson, C.L., Buratowski, S. and Lieberman, J. (2005) gamma-H2AX dephosphorylation by protein phosphatase 2A facilitates DNA double-strand break repair. *Mol Cell* 20:801-809.
- Ismail, I.H., Wadhwa, T.I. and Hammarsten, O. (2007) An optimized method for detecting gamma-H2AX in blood cells reveals a significant interindividual variation in the gamma-H2AX response among humans. *Nucleic Acids Res* 35:e36.
- Jiménez-Rabadán P, Ramón M, García-Álvarez O, Maroto-Morales A, del Olmo E, Pérez-Guzmán MD, Bisbal A, Fernández-Santos MR, Garde JJ, Soler AJ. (2012) Effect of semen collection method (artificial vagina vs. electroejaculation), extender and centrifugation on post-thaw sperm quality of Blanca-Celtibérica buck ejaculates. *Anim Reprod Sci*. 132(1-2):88-95.
- Jiménez-Rabadán, P., Soler, A.J., Ramón, M., García-Álvarez, O., Maroto-Morales, A., Iniesta-Cuerda, M., Fernández-Santos, M.R., Montoro, V., Pérez-Guzmán, M.D., Garde, J.J. (2016) Influence of semen collection method on sperm cryoresistance in small ruminants. *Anim Reprod Sci* 167:103-8.

- Jobim, M.I., Oberst, E.R., Salbego, C.G., Souza, D.O., Wald, V.B., Tramontina, F. and Mattos, R.C. (2004) Two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis of bovine seminal plasma proteins and their relation with semen freezability. *Theriogenology* 61:255-266.
- Jones, K.T. (2005) Mammalian egg activation: from Ca²⁺ spiking to cell cycle progression. *Reproduction* 130:813-823.
- Kadirvel, G., Periasamy, S. and Kumar, S. (2012) Effect of cryopreservation on apoptotic-like events and its relationship with cryocapacitation of buffalo (*Bubalus bubalis*) sperm. *Reprod Domest Anim* 47:143-150.
- Kafer, G.R., Li, X., Horii, T., Suetake, I., Tajima, S., Hatada, I. and Carlton, P.M. (2016) 5-Hydroxymethylcytosine Marks Sites of DNA Damage and Promotes Genome Stability. *Cell Rep* 14:1283-1292.
- Kaneko, T., & Serikawa, T. (2012). Successful long-term preservation of rat sperm by freeze-drying. *PLoS one*, 7(4), e35043
- Kaneko, T., Ito, H., Sakamoto, H., Onuma, M. and Inoue-Murayama, M. (2014) Sperm preservation by freeze-drying for the conservation of wild animals. *PLoS One* 9:e113381.
- Khalifa, T.A., Rekkas, C.A., Lymberopoulos, A.G., Sioga, A., Dimitriadis, I. and Papanikolaou T. (2008) Factors affecting chromatin stability of bovine spermatozoa. *Anim Reprod Sci* 104:143-163.
- Khalil, W.A., El-Harairy, M.A., Zeidan, A.E.B. and Hassan, M.A.E. (2019) Impact of selenium nano-particles in semen extender on bull sperm quality after cryopreservation. *Theriogenology* 126:121-127.
- Khalil, W.A., El-Harairy, M.A., Zeidan, A.E.B., Hassan, M.A.E. and Mohey-Elsaeed, O. (2017) Evaluation of bull spermatozoa during and after cryopreservation: Structural and ultrastructural insights. *Int J Vet Sci Med* 6:49-56.
- Kimura, Y. and Yanagimachi, R. (1995) Intracytoplasmic sperm injection in the mouse. *Biol Reprod* 52:709-720.
- Koester, D.C., Freeman, E.W., Brown, J.L., Wildt, D.E., Terrell, K.A., Franklin, A.D. and Crosier, AE. (2015) Motile Sperm Output by Male Cheetahs (*Acinonyx jubatus*) Managed Ex Situ Is Influenced by Public Exposure and Number of Care-Givers. *PLoS* 10:e0135847.
- Kuchakulla, M., Narasimman, M., Khodamoradi, K., Khosravizadeh, Z. and Ramasamy, R. (2021) How defective spermatogenesis affects sperm DNA integrity. *Andrologia* 53:e13615.
- Kumar, A., Prasad, J.K., Srivastava, N., and Ghosh, S.K. (2019) Strategies to Minimize Various Stress-Related Freeze-Thaw Damages During Conventional Cryopreservation of Mammalian Spermatozoa. *Biopreserv Biobank* 17:603-612.
- Kumar, M., Kumar, K., Jain, S., Hassan, T. and Dada, R. (2013) Novel insights into the genetic and epigenetic paternal contribution to the human embryo. *Clinics* 68:5-14.
- Kumar, N., Rai, B., Gangwar, C., Lone, S.A., Kumar, A., Gupta, S.K. and Maurya, V. (2018) Effect of different levels of egg-yolk on freezability of Jakhrana buck semen. *Indian J Anim Res* 52:20-24.
- Kumaresan A, Das Gupta M, Datta TK, Morrell JM. (2020) Sperm DNA Integrity and Male Fertility in Farm Animals: A Review. *Front Vet Sci*. 7:321.
- Kundu, C.N., Chakraborty, J., Dutta, P., Bhattacharyya, D., Ghosh, A. and Majumder, G.C. (2000) Development of a simple sperm cryopreservation model using a chemically defined medium and goat cauda epididymal spermatozoa. *Cryobiology* 40:117-125.
- Kurome, M., Ueda, H., Tomii R., Naruse, K. and Nagashima H. (2006) Production of transgenic-clone pigs by the combination of ICSI-mediated gene transfer with somatic cell nuclear transfer. *Transgenic Res* 15:229-240.
- Ladstätter, S., & Tachibana-Konwalski, K. (2016). A Surveillance Mechanism Ensures Repair of DNA Lesions during Zygotic Reprogramming. *Cell*, 167(7), 1774–1787.e13
- Lane, M., McPherson, N.O., Fullston, T., Spillane, M., Sandeman, L., Kang, W.X. and Zander-Fox, D.L. (2014) Oxidative stress in mouse sperm impairs embryo development, fetal growth and alters adiposity and glucose regulation in female offspring. *PLoS One* 9:e100832.
- Leahy, T., Marti, J.I., Evans, G. and Maxwell, W.M. (2010) Seasonal variation in the protective effect of seminal plasma on frozen-thawed ram spermatozoa. *Anim Reprod Sci* 119:147-153.

- Leboeuf, B., Restall, B. and Salamon, S. (2000) Production and storage of goat semen for artificial insemination. *Anim Reprod Sci* 62:113-41.
- Lee, J.D., Kamiguchi, Y. and Yanagimachi, R. (1996) Analysis of chromosome constitution of human spermatozoa with normal and aberrant head morphologies after injection into mouse oocytes. *Hum Reprod* 11:1942-1946.
- Lewis, S.E., O'Connell, M., Stevenson, M., Thompson-Cree, L. and McClure, N. (2004) An algorithm to predict pregnancy in assisted reproduction. *Hum Reprod* 19:1385-1394.
- Liu, C., Wang, H., Shang, Y., Liu, W., Song, Z., Zhao, H., Wang, L., Jia, P., Gao, F., Xu, Z., Yang, L., Gao, F., & Li, W. (2016). Autophagy is required for ectoplasmic specialization assembly in sertoli cells. *Autophagy*, 12(5), 814–832
- Liu, J. L., Kusakabe, H., Chang, C. C., Suzuki, H., Schmidt, D. W., Julian, M., Pfeffer, R., Bormann, C. L., Tian, X. C., Yanagimachi, R., & Yang, X. (2004). Freeze-dried sperm fertilization leads to full-term development in rabbits. *Biology of reproduction*, 70(6), 1776–1781.
- Longobardi, V., Albero, G., De Canditiis, C., Salzano, A., Natale, A., Balestrieri, A., Neglia, G., Campanile, G. and Gasparrini, B. (2017) Cholesterol-loaded cyclodextrins prevent cryocapacitation damages in buffalo (*Bubalus bubalis*) cryopreserved sperm. *Theriogenology* 89:359-364.
- Lowndes, N.F. and Toh, G.W. (2005) DNA repair: the importance of phosphorylating histone H2AX. *Curr Biol* 15:99-102.
- Lv, C., Wu, G., Hong, Q. and Quan, G. (2019) Spermatozoa Cryopreservation: State of Art and Future in Small Ruminants. *Biopreserv Biobank* 17:171-182.
- Malcuit, C., Kurokawa, M. and Fissore, R.A. (2006a) Calcium oscillations and mammalian egg activation. *J Cell Physiol* 206:565-573.
- Malcuit, C., Maserati, M., Takahashi, Y., Page, R. and Fissore, R.A. (2006b) Intracytoplasmic sperm injection in the bovine induces abnormal $[Ca^{2+}]_i$ responses and oocyte activation. *Reprod Fertil Dev* 18:39-51.
- Manicardi, G.C., Bianchi, P.G., Pantano, S., Azzoni, P., Bizzaro, D., Bianchi, U. and Sakkas, D. (1995) Presence of endogenous nicks in DNA of ejaculated human spermatozoa and its relationship to chromomycin A3 accessibility. *Biol Reprod* 52:864-867.
- Marti, E., Marti, J.I., Muiño-Blanco, T. and Cebrián-Pérez, J.A. (2008) Effect of the cryopreservation process on the activity and immunolocalization of antioxidant enzymes in ram spermatozoa. *J Androl* 29:459-467.
- Martin, G., Sabido, O., Durand, P. and Levy, R. (2004) Cryopreservation induces an apoptosis-like mechanism in bull sperm. *Biol Reprod* 71:28-37.
- Martínez-Fresneda, L., O'Brien, E., Velázquez, R., Toledano-Díaz, A., Martínez-Cáceres, C.M., Tesfaye, D., Schellander, K., García-Vázquez, F.A. and Santiago-Moreno, J. (2019) Seasonal variation in sperm freezability associated with changes in testicular germinal epithelium in domestic (*Ovis aries*) and wild (*Ovis musimon*) sheep. *Reprod Fertil Dev* 31:1545-1557.
- Martyniuk, E. & Berger, B. & Bojkovski, D. & Bouchel, D. & Hiemstra, S.J. & Marguerat, C. & Matlova, V. & Sæther, Nina. (2018). Possible consequences of the Nagoya Protocol for animal breeding and the worldwide exchange of animal genetic resources. *Acta Agriculturae Scandinavica, Section A – Animal Science*. 67. 1-11.
- Mátlová, V. (2013) Management of farm animal genetic resources in the Czech Republic The 1st International Scientific Conference Biotechnology of Farm Animals Slovak J. Anim. Sci., 46, 2013 (4): 127-130
- McManus, K.J. and Hendzel, M.J. (2005) ATM-dependent DNA damage-independent mitotic phosphorylation of H2AX in normally growing mammalian cells. *Mol Biol Cell* 16:5013-5025.
- Meerschaut, F.V., Nikiforaki, D., Heindryckx, B. and De Sutter, P. (2014) Assisted oocyte activation following ICSI fertilization failure. *Reprod Biomed Online* 28:560-571.
- Middelkamp, S., van Tol, H.T.A., Spierings, D.C.J., Boymans, S., Guryev, V., Roelen, B.A.J., Lansdorp, P.M., Cuppen, E. and Kuijk, E.W. (2020) Sperm DNA damage causes genomic instability in early embryonic development. *Sci Adv* 6:7602.

- Miller, D., Brinkworth, M. and Iles, D. (2010) Paternal DNA packaging in spermatozoa: more than the sum of its parts? DNA, histones, protamines and epigenetics. *Reproduction* 139:287-301.
- Mitchell, L.A., De Iuliis, G.N. and Aitken, R.J. (2011) The TUNEL assay consistently underestimates DNA damage in human spermatozoa and is influenced by DNA compaction and cell vitality: development of an improved methodology. *Int J Androl* 34:2-13.
- Mocé, E., Purdy, P.H. and Graham, J.K. (2010) Treating ram sperm with cholesterol-loaded cyclodextrins improves cryosurvival. *Anim Reprod Sci* 118:236-247.
- Moisan AE, Leibo SP, Lynn JW, Gómez MC, Pope CE, Dresser BL, Godke RA. (2005)
- Molinia, F.C., Evans, G. and Maxwell, W.M. (1996) Fertility of ram spermatozoa pellet-frozen in zwitterion-buffered diluents. *Reprod Nutr Dev* 36(1):21-29.
- Morita, H., Kamihata, M., Hirosawa, T., Kuwahata, A. and Ochi, M. and Horiuchi, T. (2012) Clinical application of Hg-free piezo-ICSI using fluorinert. *Fertility and Sterility* 98:S159.
- Moro, L.N., Sestelo, A.J. and Salamone, D.F. (2014) Evaluation of cheetah and leopard spermatozoa developmental capability after interspecific ICSI with domestic cat oocytes. *Reprod Domest Anim* 49:693-700.
- Morris, I.D., Iltott, S., Dixon, L. and Brison, D.R. (2002) The spectrum of DNA damage in human sperm assessed by single cell gel electrophoresis (Comet assay) and its relationship to fertilization and embryo development. *Hum Reprod* 17:990-998.
- Mostek, A., Dietrich, M.A., Słowińska, M. and Ciereszko, A. (2017) Cryopreservation of bull semen is associated with carbonylation of sperm proteins. *Theriogenology* 92:95-102.
- Muiño-Blanco, T., Pérez-Pé, R. and Cebrián-Pérez, J.A. (2008) Seminal plasma proteins and sperm resistance to stress. *Reprod Domest Anim* 43:18-31.
- Muneto, Tomomi. (2011). Full-term Development of Hamster Embryos Produced by Injecting Freeze-dried Spermatozoa into Oocytes. *Journal of Mammalian Ova Research*. 28. 32-39.
- Nashun, B., Yukawa, M., Liu, H., Akiyama, T. and Aoki, F. (2010) Changes in the nuclear deposition of histone H2A variants during pre-implantation development in mice. *Development* 137:3785-3794.
- Nashun, B., Yukawa, M., Liu, H., Akiyama, T. and Aoki, F. (2010) Changes in the nuclear deposition of histone H2A variants during pre-implantation development in mice. *Development* 137:3785-3794.
- Ohaneje, U. L., Osuagwuh, U. I., Alvarez-Rodríguez, M., Yáñez-Ortiz, I., Tabarez, A., & Palomo, M. J. (2021). The Re-Addition of Seminal Plasma after Thawing Does Not Improve Buck Sperm Quality Parameters. *Animals : an open access journal from MDPI*, 11(12), 3452.
- Ohlweiler, L.U., Brum, D.S., Leivas, F.G., Moyses, A.B., Ramos, R.S., Klein, N., Mezzalira, J.C. and Mezzalira, A. (2013) Intracytoplasmic sperm injection improves in vitro embryo production from poor quality bovine oocytes. *Theriogenology* 79:778-783.
- Oliva, R. (2006) Protamines and male infertility. *Hum Reprod Update* 12:417-435.
- Palermo, G, Joris, H., Devroey P. and Van Steirteghem, A.C. (1992) Pregnancies after intracytoplasmic injection of single spermatozoon into an oocyte. *Lancet* 340:17-18.
- Pellicer-Rubio, M.T. and Combarous, Y. (1998) Deterioration of goat spermatozoa in skimmed milk-based extenders as a result of oleic acid released by the bulbourethral lipase BUSgp60. *J Reprod Fertil* 112:95-105.
- Pellicer-Rubio, M.T., Magallon, T. and Combarous, Y. (1997) Deterioration of goat sperm viability in milk extenders is due to a bulbourethral 60-kilodalton glycoprotein with triglyceride lipase activity. *Biol Reprod* 57:1023-1031.
- Peña, F.J., O'Flaherty, C., Ortiz Rodríguez, J.M, Martín Cano, F.E, Gaitskell-Phillips, G.L., Gil, M.C. and Ortega Ferrusola, C. (2019) Redox Regulation and Oxidative Stress: The Particular Case of the Stallion Spermatozoa. *Antioxidants* 8:567.
- Penfold, L.M., Jost, L., Evenson, D.P. and Wildt, D.E. (2003) Normospermic versus teratospermic domestic cat sperm chromatin integrity evaluated by flow cytometry and intracytoplasmic sperm injection. *Biol Reprod* 69:1730-1735.

- Peris, S.I., Bilodeau, J.F., Dufour, M. and Bailey, J.L. (2007) Impact of cryopreservation and reactive oxygen species on DNA integrity, lipid peroxidation, and functional parameters in ram sperm. *Mol Reprod Dev* 74:878-892.
- Peris, S.I., Morrier, A., Dufour, M. and Bailey, J.L. (2004) Cryopreservation of ram semen facilitates sperm DNA damage: relationship between sperm andrological parameters and the sperm chromatin structure assay. *J Androl* 25:224-233.
- Peris-Frau, P., Soler, A.J., Iniesta-Cuerda, M., Martín-Maestro, A., Sánchez-Ajofrín, I., Medina-Chávez, D.A., Fernández-Santos, M.R., García-Álvarez, O., Maroto-Morales, A., Montoro, V. and Garde, J.J. (2020) Sperm Cryodamage in Ruminants: Understanding the Molecular Changes Induced by the Cryopreservation Process to Optimize Sperm Quality. *Int J Mol Sci* 21:2781.
- Perumal, P., Savino, N., Sangma, C.T.R., Khan, M.H., Ezung, E., Chang, S. and Sangtam, T.Z.T. (2017) Seasonal effect on physiological, reproductive and fertility profiles in breeding mithun bulls. *Asian Pac J Reprod* 6:268-278.
- Pilch, D.R., Sedelnikova, O.A., Redon, C., Celeste, A., Nussenzweig, A. and Bonner, W.M. (2003) Characteristics of gamma-H2AX foci at DNA double-strand breaks sites. *Biochem Cell Biol* 81:123-129.
- Pini, T., Leahy, T. and de Graaf, S.P. (2018b) Sublethal sperm freezing damage: Manifestations and solutions. *Theriogenology* 118:172-181.
- Pini, T., Rickard, J.P., Leahy, T., Crossett, B., Druart, X. and de Graaf, S.P. (2018a) Cryopreservation and egg yolk medium alter the proteome of ram spermatozoa. *J Proteomics* 181:73-82.
- Pogozhykh, D., Pakhomova, Y., Pervushina, O., Hofmann, N., Glasmacher, B., & Zhegunov, G. (2017). Exploring the Possibility of Cryopreservation of Feline and Canine Erythrocytes by Rapid Freezing with Penetrating and Non-Penetrating Cryoprotectants. *PloS one*, 12(1), e0169689.
- Prieto-Martínez, N., Morató, R., Muiño, R., Hidalgo, C.O., Rodríguez-Gil, J.E., Bonet, S. and Yeste, M. (2017) Aquaglyceroporins 3 and 7 in bull spermatozoa: identification, localisation and their relationship with sperm cryotolerance. *Reprod Fertil Dev* 29:1249-1259.
- Ptáček, M., Stádníková, M., Savvulidi, F. & Stádník, L. (2019). Ram Semen Cryopreservation Using Egg Yolk or Egg Yolk-free Extenders: Preliminary Results. *Scientia Agriculturae Bohemica*, 50(2) 96-103.
- Purdy, P.H. (2006) A review on goat sperm cryopreservation. *Small Ruminant Research* 63:215-225.
- Redon, C.E., Nakamura, A.J., Zhang, Y.W., Ji, J.J., Bonner, W.M., Kinders, R.J., Parchment, R.E., Doroshow, J.H. and Pommier, Y. (2010) Histone gammaH2AX and poly(ADP-ribose) as clinical pharmacodynamic biomarkers. *Clin Cancer Res* 16:4532-4542.
- Reichmann, J., Nijmeijer, B., Hossain, M. J., Eguren, M., Schneider, I., Politi, A. Z., Roberti, M. J., Hufnagel, L., Hiiragi, T., & Ellenberg, J. (2018). Dual-spindle formation in zygotes keeps parental genomes apart in early mammalian embryos. *Science (New York, N.Y.)*, 361(6398), 189–193. *Reproduction* 142:529-538.
- Ribas-Maynou, J., García-Peiró, A., Abad, C., Amengual, M.J., Navarro, J. and Benet, J. (2012) Alkaline and neutral Comet assay profiles of sperm DNA damage in clinical groups. *Hum Reprod* 27:652-658.
- Rickard, J. P., Leahy, T., Soleilhavoup, C., Tsikis, G., Labas, V., Harichaux, G., Lynch, G. W., Druart, X., & de Graaf, S. P. (2015). The identification of proteomic markers of sperm freezing resilience in ram seminal plasma. *Journal of proteomics*, 126, 303–311.
- Robles, V., Valcarce, D.G., and Riesco, M.F. (2019) The Use of Antifreeze Proteins in the Cryopreservation of Gametes and Embryos. *Biomolecules* 9:181.
- Rogakou, E.P., Pilch, D.R., Orr, A.H., Ivanova, V.S. and Bonner, W.M. (1998) DNA double-stranded breaks induce histone H2AX phosphorylation on serine 139. *J Biol Chem* 273:5858-5868.
- Roldan, E.R., Gomendio, M., Garde, J.J., Espeso, G., Ledda, S., Berlinguer, F., del Olmo, A., Soler, A.J., Arregui, L., Crespo, C. and González, R. (2006) Inbreeding and reproduction in endangered ungulates: preservation of genetic variation through the Organization of Genetic Resource Banks. *Reprod Domest Anim* 41:82-92.

- Rychtarova, J., Langerova, A., Fulka, H., Loi, P., Benc, M., & Fulka, J., Jr (2021). Interspecific ICSI for the Assessment of Sperm DNA Damage: Technology Report. *Animals : an open access journal from MDPI*, 11(5), 1250
- Sakkas, D. and Alvarez, J.G. (2010) Sperm DNA fragmentation: mechanisms of origin, impact on reproductive outcome, and analysis. *Fertil Steril* 93:1027-1036.
- 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 online*, 7(4), 428–432.
- Salamone, D.F., Canel, N.G. and Rodríguez, M.B. (2017) Intracytoplasmic sperm injection in domestic and wild mammals. *Reproduction* 154:F111-F124.
- Salgado, R.M, Brom-de-Luna, J.G., Resende, H.L., Canesin, H.S. and Hinrichs, K. (2018) Lower blastocyst quality after conventional vs. Piezo ICSI in the horse reflects delayed sperm component remodeling and oocyte activation. *J Assist Reprod Genet* 35:825-840.
- Salmon, V.M., Leclerc, P. and Bailey, J.L. (2016) Cholesterol-Loaded Cyclodextrin Increases the Cholesterol Content of Goat Sperm to Improve Cold and Osmotic Resistance and Maintain Sperm Function after Cryopreservation. *Biol Reprod* 94:85.
- Sánchez-Rubio, F., Fernández-Santos, M.R., Castro-Vázquez, L., García-Álvarez, O., Maroto-Morales, A., Soler, A.J., Martínez-Pastor, F. and Garde, J.J. (2018) Cinnamtannin B-1, a novel antioxidant for sperm in red deer. *Anim Reprod Sci* 195:44-52.
- Sanusi, R., Yu, Y., Nomikos, M., Lai, F.A. and Swann, K. (2015) Rescue of failed oocyte activation after ICSI in a mouse model of male factor infertility by recombinant phospholipase C ζ . *Mol Hum Reprod* 21:783-791.
- Saragusty J. (2012) Genome Banking for Vertebrates Wildlife Conservation. In: Katkov II
- Sarangi, A., Singh, P., Virmani, M., Yadav, A.S., Sahu, S., Ajithakumar, H.M., Kumari, A. and Rath, A.P. (2017) Effect of antioxidants supplementation on the quality of Beetal buck semen stored at 4°C. *Vet World* 10:1184-1188.
- Saunders, C.M., Larman, M.G., Parrington, J., Cox, L.J., Royse, J., Blayney, L.M., Swann, K. and Lai, F.A. (2002) PLC zeta: a sperm-specific trigger of Ca(2+) oscillations in eggs and embryo development. *Development* 129:3533-3544.
- Shahin, M.A., Khalil, W.A., Saadeldin, I.M., Swelum, A.A. and El-Harairy, M.A. (2020) Comparison between the Effects of Adding Vitamins, Trace Elements, and Nanoparticles to SHOTOR Extender on the Cryopreservation of Dromedary Camel Epididymal Spermatozoa. *Animals* 10:78.
- Shamsi, M. B., Kumar, R., & Dada, R. (2008). Evaluation of nuclear DNA damage in human spermatozoa in men opting for assisted reproduction. *The Indian journal of medical research*, 127(2), 115–123.
- Shamsi, M. B., Venkatesh, S., Kumar, R., Gupta, N. P., Malhotra, N., Singh, N., Mittal, S., Arora, S., Arya, D. S., Talwar, P., Sharma, R. K., & Dada, R. (2010). Antioxidant levels in blood and seminal plasma and their impact on sperm parameters in infertile men. *Indian journal of biochemistry & biophysics*, 47(1), 38–43.
- Shamsi, M.B., Imam, S.N. and Dada, R. (2011) Sperm DNA integrity assays: diagnostic and prognostic challenges and implications in management of infertility. *J Assist Reprod Genet* 28:1073-1085.
- Sharma, A. and Sood, P. (2020) Caprine semen cryopreservation and the factors affecting it: An overview. *Veterinary Sciences: Research and Reviews* 6:46-57.
- Sherman, J.K. (1957) Freezing and freeze-drying of bull spermatozoa. *Am J Physiol* 190:
- Schlegel, P.N. and Girardi, S.K. (1997) Clinical review 87: In vitro fertilization for male factor infertility. *J Clin Endocrinol Metab* 82:709-716.
- Singh, N.P., Danner, D.B., Tice, R.R., McCoy, M.T., Collins, G.D. and Schneider, E.L. (1989) Abundant alkali-sensitive sites in DNA of human and mouse sperm. *Exp Cell Res* 184:461-470.
- Steger, K., Cavalcanti, M.C. and Schuppe, H.C. (2011) Prognostic markers for competent human spermatozoa: fertilizing capacity and contribution to the embryo. *Int J Androl* 34:513-527.

- Stricker SA. (1999) Comparative biology of calcium signaling during fertilization and egg activation in animals. *Dev Biol.* 211(2):157-76.
- Swann, K. and Lai, F.A. (2016) Egg Activation at Fertilization by a Soluble Sperm Protein. *Physiol Rev* 96:127-149.
- Sztankóová, Z., Mátlová, V., Kysel'ová, J., Jandurová, O. M., Ríha, J., & Senese, C. (2009). Short communication: Polymorphism of casein cluster genes in Czech local goat breeds. *Journal of dairy science*, 92(12), 6197–6201.
- Tarozzi, N., Bizzaro, D., Flamigni, C. and Borini, A. (2007) Clinical relevance of sperm DNA damage in assisted reproduction. *Reprod Biomed Online* 14:746-757.
- Tesarik, J., Greco, E. and Mendoza, C. (2004) Late, but not early, paternal effect on human embryo development is related to sperm DNA fragmentation. *Hum Reprod* 19:611-615.
- Tesarik, J., Mendoza-Tesarik, R. and Mendoza, C. (2006) Sperm nuclear DNA damage: update on the mechanism, diagnosis and treatment. *Reprod Biomed Online* 12:715-721.
- Troca-Marín, J.A. and Geijo-Barrientos, E. (2010) Inhibition by 5-HT of the synaptic responses evoked by callosal fibers on cortical neurons in the mouse. *Pflugers Arch* 460:1073-1085.
- Tunc, O. and Tremellen, K. (2009) Oxidative DNA damage impairs global sperm DNA methylation in infertile men. *J Assist Reprod Genet* 26:537-544.
- Uehara, T., Yanagimachi R. (1976) Microsurgical Injection of Spermatozoa into Hamster Eggs with Subsequent Transformation of Sperm Nuclei into Male Pronuclei. *Biol Reprod* 15: 467-470.
- Valdiglesias, V., Giunta, S., Fenech, M., Neri, M. and Bonassi, S. (2013) γ H2AX as a marker of DNA double strand breaks and genomic instability in human population studies. *Mutat Res* 753:24-40.
- Verma, A., Rajput, S., De, S., Kumar ,R., Chakravarty, A.K. and Datta, T.K. (2014) Genome-wide profiling of sperm DNA methylation in relation to buffalo (*Bubalus bubalis*) bull fertility. *Theriogenology* 82:750-759.
- Virro, M.R., Larson-Cook, K.L. and Evenson, D.P. (2004) Sperm chromatin structure assay (SCSA) parameters are related to fertilization, blastocyst development, and ongoing pregnancy in in vitro fertilization and intracytoplasmic sperm injection cycles. *Fertil Steril* 81:1289-1295.
- Wakayama, T., & Yanagimachi, R. (1998). Development of normal mice from oocytes injected with freeze-dried spermatozoa. *Nature biotechnology*, 16(7), 639–641
- Wake, D. B., & Vredenburg, V. T. (2008). Colloquium paper: are we in the midst of the sixth mass extinction? A view from the world of amphibians. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 105 Suppl 1(Suppl 1), 11466–11473.
- Watanabe, H., Suzuki, H., Tateno, H. and Fukui, Y. (2010) A novel method for detection of chromosomal integrity in cryopreserved livestock spermatozoa using artificially fused mouse oocytes. *J Assist Reprod Genet* 27:581-588.
- Watson, P.F. (1995) Recent developments and concepts in the cryopreservation of spermatozoa and the assessment of their post-thawing function. *Reprod Fertil Dev* 7:871-91.
- Weigel, K. A. (2001). Controlling inbreeding in modern breeding programs. *J. Dairy Sci.* 84.
- Westfalewicz, B., Dietrich, M., Słowińska, M., Judycka, S. and Ciereszko A. (2019) Seasonal changes in the proteome of cryopreserved bull semen supernatant. *Theriogenology* 126:295-302.
- Westfalewicz, B., Dietrich, M.A. and Ciereszko, A. (2015) Impact of cryopreservation on bull semen proteome. *J Anim Sci* 93:5240-5253.
- Wildt, D.E., Comizzoli, P., Pukazhenti, B. and Songsasen, N. (2010) Lessons from biodiversity--the value of nontraditional species to advance reproductive science, conservation, and human health. *Mol Reprod Dev* 77:397-409.
- Wojtusik, J., Wang, Y. and Pukazhenti, B.S. (2018) Pretreatment with cholesterol-loaded cyclodextrins prevents loss of motility associated proteins during cryopreservation of addra gazelle (*Nanger dama ruficollis*) spermatozoa. *Cryobiology* 81:74-80.

- Wossidlo, M., Arand, J., Sebastiano, V., Lepikhov, K., Boiani, M., Reinhardt, R., Schöler, H. and Walter, J. (2010) Dynamic link of DNA demethylation, DNA strand breaks and repair in mouse zygotes. *EMBO J* 29:1877-1888.
- Yamauchi, Y., Shaman, J.A., Boaz, S.M. and Ward, W.S. (2007) Paternal pronuclear DNA degradation is functionally linked to DNA replication in mouse oocytes. *Biol Reprod* 77:407-415.
- Yamauchi, Y., Doe, B., Ajduk, A. and Ward, M.A. (2007a) Genomic DNA damage in mouse transgenesis. *Biol Reprod* 77:803-812.
- Yamauchi, Y., Shaman, J.A. and Ward, W.S. (2011) Non-genetic contributions of the sperm nucleus to embryonic development. *Asian J Androl* 13:31-35.
- Yamauchi, Y., Ward, M.A. and Ward, W.S. (2009) Asynchronous DNA replication and origin licensing in the mouse one-cell embryo. *J Cell Biochem* 107:214-223.
- Yanagida, K., Katayose, H., Hirata, S., Yazawa, H., Hayashi, S. and Sato, A. (2001) Influence of sperm immobilization on onset of Ca(2+) oscillations after ICSI. *Hum Reprod* 16:148-152.
- Yeste, M. (2016) Sperm cryopreservation update: Cryodamage, markers, and factors affecting the sperm freezability in pigs. *Theriogenology* 85:47-64.
- Yoon, S.J., Kwon, W.S., Rahman, M.S., Lee, J.S. and Pang M.G. (2015) A novel approach to identifying physical markers of cryo-damage in bull spermatozoa. *PLoS One* 10:e0126232.
- Yoon, S.J., Rahman, M.S., Kwon, W.S., Ryu, D.Y., Park, Y.J. and Pang, M.G. (2016a) Proteomic identification of cryostress in epididymal spermatozoa. *J Anim Sci Biotechnol* 7:67.
- Yoon, S.J., Rahman, M.S., Kwon, W.S., Park, Y.J. and Pang, M.G. (2016b) Addition of Cryoprotectant Significantly Alters the Epididymal Sperm Proteome. *PLoS One* 11:e0152690.
- Yoon, S.Y. and Fissore, R.A. (2007) Release of phospholipase C zeta and [Ca²⁺]_i oscillation-inducing activity during mammalian fertilization. *Reproduction* 134:695-704.
- Yoshida, N. and Perry, A. (2007) Piezo-actuated mouse intracytoplasmic sperm injection (ICSI). *Nat Protoc* 2: 296–304.
- Zhang, W., Walboomers, X. F., Shi, S., Fan, M., and Jansen, J. A. (2006) “Multilineage Differentiation Potential of Stem Cells Derived from Human Dental Pulp after Cryopreservation.” *Tissue Engineering* 12: 2813–23.
- Ziegler-Birling, C., Helmrich, A., Tora, L. and Torres-Padilla, M.E. (2009) Distribution of p53 binding protein 1 (53BP1) and phosphorylated H2A.X during mouse preimplantation development in the absence of DNA damage. *Int J Dev Biol* 53:1003-1011.

Knihy:

FAO. 2015 The Second Report on the State of the World's Animal Genetic Resources for Food and Agriculture. Scherf BD, Pilling D. FAO Commission on Genetic Resources for Food and Agriculture Assessments. Rome