

Univerzita Karlova
Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Biologie

Studijní obor: Biologie



Magdaléna Tušlová

Poškození DNA spermií: metody detekce využívané v klinické praxi
Sperm DNA damage: detection methods used in clinical practice

Bakalářská práce

Vedoucí práce/Školitel: RNDr. Pavla Postlerová, Ph.D.

Konzultant: Ing. Ondřej Šimoník, Ph.D.

Praha, 2024

Poděkování:

Tímto bych ráda poděkovala své školitelce RNDr. Pavle Postlerové, Ph.D. a konzultantovi Ing. Ondřeji Šimoníkovi, Ph.D. za odborné vedení mé práce. Především děkuji za jejich čas, cenné rady a vstřícný přístup. Poděkování patří i mé rodině a přátelům za jejich podporu během celého studia.

Prohlášení:

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, 20.4. 2024

Magdaléna Tušlová

Abstrakt

Současná rutinní analýza spermatu, známá jako spermogram, není schopna poskytnout úplný obraz o mužské plodnosti, jelikož standardně nezahrnuje hodnocení integrity DNA. Tento parametr úzce souvisí s potížemi během početí a se zvýšeným rizikem potratu. Tato práce se zabývá příčinami vzniku poškození DNA spermií, detekcí tohoto poškození pomocí různých metod a závěrem diskutuje o možnostech začlenění těchto testů do klinické praxe za účelem zlepšení hodnocení a léčby mužské plodnosti. Mezi mechanismy vzniku fragmentace DNA spermií patří narušení spermiogeneze, oxidativní stres a poruchy apoptózy, které mohou být ovlivněny genetickými, anatomickými i vnějšími faktory. Hlavní část práce byla věnována rešerši metod detekce fragmentace DNA spermií, zahrnující analýzu struktury chromatinu spermií (SCSA), test disperze chromatinu spermií (SCD), metodu TUNEL, test na základě rozpoznání jednořetězcových zlomů DNA (ISNT), kometovou analýzu a barvení chromatinu. Přestože jsou některé z těchto metod často používané, stále zůstávají výzvy v jejich standardizaci a plném začlenění do klinické praxe. Možnost jejich rutinního využití by však mohla přinést významné pokroky v diagnostice a léčbě mužské neplodnosti. Mezi testy s největším potenciálem pro rutinní začlenění patří SCSA, TUNEL či SCD, a to díky jejich rychlosti, přesnosti či lepší standardizaci v porovnání s jinými metodami.

Klíčová slova: mužská neplodnost, spermie, fragmentace DNA, klinická praxe

Abstract

The current routine semen analysis, known as a spermiogram, is not able to provide a complete picture of male fertility as it does not routinely include an assessment of DNA integrity. This parameter is closely related to difficulties during conception and increased risk of miscarriage. This paper discusses the causes of sperm DNA damage, the detection of this damage by various methods and concludes with a discussion of the possibilities of incorporating these tests into clinical practice to improve the assessment and treatment of male fertility. Mechanisms of sperm DNA fragmentation include impaired spermatogenesis, oxidative stress and impaired apoptosis, which can be influenced by genetic, anatomical and external factors. The main part of this thesis was devoted to a review of methods for the detection of sperm DNA fragmentation, including sperm chromatin structure analysis (SCSA), sperm chromatin dispersion test (SCD), TUNEL method, single-strand DNA break recognition test (ISNT), comet assay and chromatin staining. Although some of these methods are frequently used, challenges remain in their standardization and full integration into clinical practice. However, the possibility of their routine use could bring significant advances in the diagnosis and treatment of male infertility. Among the tests with the greatest potential for routine incorporation are SCSA, TUNEL or SCD, due to their speed, accuracy or better standardization compared to other methods.

Keywords: male infertility, sperm, DNA fragmentation, clinical practice

Seznam zkratek

AO	akridinová oranž
ASRM	Americká společnost pro reprodukční medicínu
ATP	adenosintrifosfát
AUA	Americká urologická asociace
CASP	z angl. Comet Assay Software Project
CMA3	chromomycin A3
DAPI	4',6-diamidin-2-fenylindol
DBD-FISH	z angl. DNA Breakage Detection Fluorescence In Situ Hybridization
DFI	index fragmentace DNA (z angl. DNA Fragmentation Index)
Diff-Quick	z angl. Differential Quick staining kit
DNA	deoxyribonukleová kyselina
dsDNA	dvouvláknová (double-stranded) DNA
dUTP	deoxyuridintrifosfát
FC	průtokový cytometr (z angl. Flow Cytometry)
FITC	fluorescein isothiokyanát
FSH	folikuly stimulační hormon
GC	guanin-cytosin pár
HDS	z angl. High Dna Stainability
HRP	křenuv peroxidáza (z angl. Horse Radish Peroxidase)
ICSI	intracytoplazmatická injekce spermií
ISNT	z angl. In Situ Nick Translation
IUI	intrauterinní inseminace
IVF	in vitro fertilizace
LH	luteinizační hormon
ROS	reaktivní formy kyslíku (z angl. Reactive Oxygen Species)
SCD	z angl. Sperm Chromatin Dispersion
SCGE	z angl. Single Cell Gel Electrophoresis
SCSA	z angl. Sperm Chromatin Structure Assay
SDF	fragmentace DNA spermií (z angl. Sperm DNA Fragmentation)
ssDNA	jednovláknová (single-stranded) DNA
TdT	terminální deoxynukleotidyl transferáza
TUNEL	z angl. Terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP Nick End Labeling
WHO	Světová zdravotnická organizace (z angl. World Health Organization)

Obsah

1	Úvod.....	1
2	Spermatogeneze.....	2
3	Příčiny vzniku poškození DNA	3
3.1	Vnitřní příčiny	4
3.1.1	Poruchy přestavby chromatinu	4
3.1.2	Oxidativní stres	4
3.1.3	Neúspěšná apoptóza.....	5
3.2	Defekty tkání a buněk.....	6
3.3	Vnější příčiny	6
3.3.1	Věk.....	6
3.3.2	Léčba rakoviny	7
3.3.3	Životní styl.....	7
4	Metody detekce fragmentované DNA spermií	8
4.1	Metoda SCSA (Sperm Chromatin Structure Analysis).....	9
4.2	SCD (Sperm Chromatin Dispersion test).....	11
4.3	TUNEL (Terminal deoxynucleotidyl transferase mediated dUTP Nick End Labeling).....	13
4.4	ISNT (In Situ Nick Translation).....	15
4.5	SCGE (Single Cell Gel Electrophoresis).....	16
4.6	Techniky barvení pro hodnocení struktury chromatinu	18
4.6.1	Barvení chromomycinem A3 (CMA3).....	18
4.6.2	Barvení toluidinovou modří.....	20
4.6.3	Barvení anilinovou modří	20
5	Testování v klinické praxi	21
6	Závěr	25
7	Seznam použité literatury	27

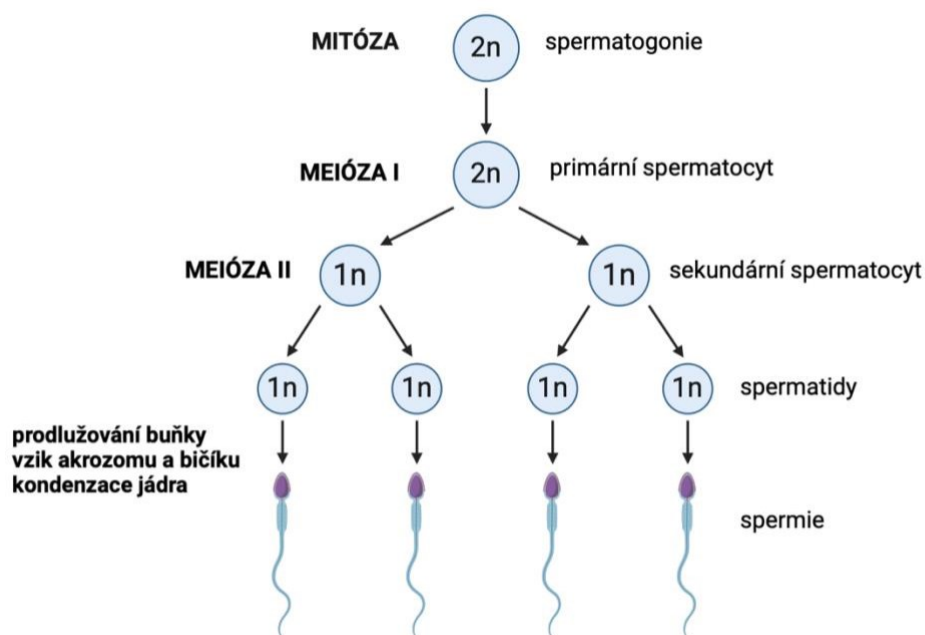
1 Úvod

V posledních letech se v lidské populaci čím dál častěji objevují problémy s plodností. Podle WHO lze definovat neplodnost jako nejméně jeden rok pravidelného nechráněného pohlavního styku bez dosažení přirozeného početí, přičemž se na tomto stavu podílejí jak mužské, tak ženské faktory. Tato práce je zaměřena na ten mužský, tedy kvalitu ejakulátu. Běžně je pro kontrolu této kvality používán spermioqram, který poskytuje informace o funkčních parametrech spermií. Na základě daných parametrů, které stanovila WHO je pak hodnocena koncentrace spermií, jejich pohyblivost či morfologie, ale i další vlastnosti. V současné době je diskutována nedostatečnost tohoto rutinního vyšetření. Za důležitý marker plodnosti je totiž považována i integrita spermatické DNA, která je důležitá pro správný přenos genetického materiálu během procesu oplození. Spermie s fragmentovanou DNA mají menší šanci oplodnit vajíčko a v případě oplození mohou vést k vyššímu riziku potratu. Poškozená DNA je pak charakteristická jednovláknovými či dvouvláknovými zlomy. Vznik těchto zlomů může být různý. Vliv mohou mít jak vnitřní, tak vnější faktory. Míra fragmentované DNA ve spermatickém jádře je pak hodnocena pomocí různých testů. Tyto testy se mezi sebou liší svými specifickými vlastnostmi, konkrétním postupem či způsobem vyhodnocení. Začlenění těchto testů do rutinní praxe by přineslo další pokrok v hodnocení či léčbě mužské plodnosti, ale i v použití technik asistované reprodukce.

Cílem této bakalářské práce je shrnutí možných příčin poškození DNA spermií, představení metod pro detekci tohoto poškození a na základě současných poznatků diskutovat vlastnosti těchto testů, výhody a nevýhody či jejich použití v klinické praxi.

2 Spermatogeneze

Vývoj spermatických buněk začíná během puberty a trvá po celý život. Proces tohoto vývoje se označuje jako spermatogeneze a u lidí trvá přibližně 74 dnů. Celý proces lze dělit na mitózu, meiózu a spermiogenezi. Samotná tvorba buněk probíhá v semenotvorných kanálcích, které ústí do rete testis a následně do nadvarlete (Plant et al., 2015*). Během mitotické části dochází k proliferaci a obnovování spermatogonií. V semenotvorných kanálcích jsou vyvíjející se spermatogonie obklopeny podpůrnými Sertoliho buňkami. Nediferencované spermatogonie se označují jako typ A, které jsou dále děleny do dvou skupin na světlé a tmavé (Clermont, 1963). Tmavé spermatogonie pravidelně proliferují a podstupují několik sebeobnovujících dělení pro udržení populace kmenových buněk (Plant et al., 2015*). Ty světlé se dále diferencují na spermatogonie typu B, které dávají vznik preleptotenním neboli primárním spermatocytům. Výsledkem mitotické fáze jsou tedy primární spermatocyty, které dále podstupují redukční dělení. Meióza je proces dvou po sobě jdoucím redukčních dějů, označovaných jako meióza I a meióza II. Primární spermatocyt podléhá tomu prvnímu, jehož výsledkem jsou dva sekundární spermatocyty, které vstupují do druhého meiotického dělení (Clermont, 1963). Proces meiózy tak trvá 16 dní a výsledkem jsou čtyři haploidní spermatidy (viz *Obrázek 1*), které se dále nedělí (Heller & Clermont, 1963).



Obrázek 1: Schéma spermatogeneze (vlastní zpracování)

Haploidní spermatidy vstupují do třetí fáze celého vývoje, tedy spermiogeneze. Během této fáze dochází k významné diferenciaci spermatid v podobě formování akrozomu, ukončení genové exprese, odstranění velké části cytoplazmy, prodloužení buňky nebo vývoje bičíku (Plant et al., 2015*). Mění se tak výrazně morfologie buňky. Nezbytnou součástí spermiogeneze je také proces protaminace, tedy kompletní přestavba chromatinu spermií. Lidské spermie obsahují 2 hlavní jaderné proteiny, protaminy a histony. Protaminy jsou bohaté na vysoce bazické aminokyseliny, arginin a cystein (Balhorn et al., 1977). U člověka najdeme dva geny kódující dva různé protaminy, P1 a P2. Jejich poměr v buňce by pak měl odpovídat 1:1 (de Yebra et al., 1993). Pro dosažení vysoké úrovně kondenzace chromatinu dochází k výměně histonů za protaminy. Nahrazeno je až 85 % histonů, zatímco zbylých 15 % je stále vázáno na DNA. Histony jsou nejprve nahrazeny přechodnými proteiny a teprve poté samotnými protaminy. Výsledkem je 6 - 20krát kompaktnější chromatin než chromatin somatických buněk (Plant et al., 2015*). Výměna tak vede k vyšší odolnosti struktury chromatinu a poskytuje tak ochranu před možným poškozením DNA (Aoki et al., 2006). Více o samotném vzniku poškození v kapitole s názvem *Příčiny vzniku poškození DNA*. Odolnost struktury je pak důležitá i pro správný průběh procesu oplodnění (Henkel et al., 2004).

Výsledkem spermatogeneze jsou tedy maturované, pohyblivé spermie s vytvořeným akrozomem a vysoce kompaktní DNA. Celý proces je řízen hormonálně, a to gonadotropními hormony FSH a LH. Folikuly stimulující hormon (FSH) aktivuje genovou expresi a signály důležité pro tvorbu spermií. Luteinizační hormon (LH) zabezpečuje produkci testosteronu, přesněji řečeno stimuluje Leydigovy buňky pro jeho tvorbu.

3 Příčiny vzniku poškození DNA

Dle WHO je za poškození DNA považována jakákoli chemická změna v rámci normální struktury DNA spermie. K těmto změnám patří DNA fragmentace, která postihuje genetický materiál spermie, a to ve formě jednovláknových či dvouvláknových zlomů. Struktura chromatinu spermatických buněk je jedním z důležitých faktorů pro hodnocení lidské plodnosti. K samotnému poškození DNA může dojít již během spermatogeneze, v rámci dějů naprogramované buněčné smrti či vlivem oxidativního stresu. Vliv mají také anatomické či genetické defekty, ale i vnější faktory jako je věk, léčba rakoviny, environmentální faktory či životní styl (WHO, 2021).

3.1 Vnitřní příčiny

3.1.1 Poruchy přestavby chromatinu

Kritickým úsekem spermatogeneze je přestavba DNA během prodlužování spermií, tedy fáze spermiogeneze. V této fázi, jak již bylo zmíněno dochází k výrazné morfologické přestavbě jádra, zahrnující výměnu histonů za protaminy a zhutňování chromatinu. Během výměny jaderných proteinů dochází ke vzniku dočasného poškození, které tak snižuje torzní napětí. Za vznik těchto zlomů je zodpovědný enzym topoizomeráza II (Laberge & Boissonneault, 2005). Dočasné je proto, že zlomy jsou detekovány během procesu spermiogeneze, ale ve zralých spermiích již přítomny nejsou. Za normálních podmínek tedy dochází k odstranění těchto zlomů, a to během průchodu spermie nadvarletem či po samotné ejakulaci. Pokud k této opravě nedojde, maturovaná spermie obsahuje fragmentovanou DNA a po oplození vajíčka takovouto spermií vznikají komplikace v průběhu těhotenství, negativně je ovlivněna kvalita embryí či tvorba blastocyst (Zheng et al., 2018). Z dočasného poškození se tedy stává trvalé, maturované spermie už nejsou schopné oprav, jelikož je u nich zastavena transkripční aktivita. Existují různé opravné mechanismy, jedním z nich je homologní rekombinace, avšak haploidní spermatické buňky nejsou tohoto procesu schopny (Meyer-Ficca et al., 2009). Pro diploidní somatické buňky jsou tedy tyto opravy o něco jednodušší.

Se zvýšenou fragmentací DNA spermií je spojován i abnormálně vysoký či nízký poměr dvou typů protaminů P1 a P2 (Simon et al., 2011). V neporušeném jádře lidské spermie se tyto protaminy vyskytují ve stejném množství (kapitola 2 *Spermatogeneze*). Vychýlení tohoto poměru vede ke zvýšené náchylnosti spermatické DNA k poškození, negativně je pak ovlivněna fertilizační schopnost spermie a abnormální hladiny protaminů jsou tak jednou z možných příčin podílejících se na neplodnosti (Carrell & Liu, 2001).

3.1.2 Oxidativní stres

Oxidativní stres je jeden z nejběžnějších faktorů způsobující poškození DNA spermie. Hlavním negativním důsledkem je narušení struktury plazmatické membrány či ztráta motility spermií (Jones et al., 1979), přičemž zdrojem pro vznik tohoto poškození jsou reaktivní formy kyslíku (ROS, z angl. Reactive Oxygen Species). ROS jsou volné kyslíkové radikály, které se přirozeně vyskytují v lidských buňkách. Nemusí mít tedy vždy negativní dopad. Jejich působení je důležité pro kapacitaci spermie, v procesu akrozomální reakce či splnutí spermie s oocytem (De Lamirande & Cagnon, 1993). Mezi ROS se řadí superoxidové anionty, peroxid vodíku a hydroxylové radikály (Sies, 1985*). Jejich množství je pak koordinováno antioxidanty.

Narušení rovnováhy mezi hladinou ROS a antioxidanty vede ke vzniku oxidačního stresu a následným patogenním účinkům. ROS pak převažují nad antioxidační obranou, která se dále dělí na enzymatickou a neenzymatickou složku. Mezi ty enzymatické se řadí superoxiddismutáza (Di Naso et al., 2011), glutathionperoxidáza (Tsuru-Aoyagi et al., 2009) či kataláza (Slaughter & O'Brien, 2000). K neenzymatickým antioxidantům patří vitamin E (Khorramabadi et al., 2019), vitamin A (Jin et al., 2014) nebo kyselina askorbová (Kawashima et al., 2015).

Působení ROS má vysoce negativní účinky na spermatické buňky, a to především na jejich membránu. Plazmatická membrána spermií obsahuje zvýšené množství polynenasycených mastných kyselin, především kyselinu dekosahexaenovou (Tavilani et al., 2006). Ta je zodpovědná za fluiditu membrány. Peroxidace způsobuje destrukci dvojných vazeb těchto mastných kyselin a tím pádem i rozpad samotné membrány. Porušením membránové struktury je spermatická DNA přímo vystavena ROS přítomných v semenné plazmě. Dochází tak k narušení celkové integrity DNA a následnému vzniku řetězcových zlomů, které pak korelují s negativním dopadem na mužskou fertilitu (Xie et al., 2018).

Jak již bylo zmíněno, ROS mohou být přítomné v lidských buňkách i za normálních okolností. Jejich původ je různý, především jsou vedlejším produktem aerobního metabolismu v mitochondriích, kde probíhá syntéza ATP. V semenné plazmě je generují hlavně leukocyty, ale na produkci ROS se mohou podílet i samotné spermie (Henkel et al., 2005) nebo také vnější faktory, například působení tepelného stresu (Houston et al., 2018). Prokázána byla také korelace vyšší hladiny oxidačního poškození se stárnutím buněk (Vaughan et al., 2020).

3.1.3 Neúspěšná apoptóza

Apoptóza neboli naprogramovaná buněčná smrt je zásadní pro regulaci spermatogeneze, kontrolu kvality spermií a jejich správné funkce. Během samotného procesu dochází ke kondenzaci jaderného chromatinu, fragmentaci jádra a celkovému smršťování buňky. Buňka se nakonec rozpadne na apoptická tělíska, která jsou následně odstraněna fagocytózou (Kerr et al., 1972*). Za průběh a aktivaci naprogramované buněčné smrti jsou zodpovědné enzymy kaspázy (Brentnall et al., 2013). Iniciací samotného procesu zprostředkovává receptor Fas, který je exprimovaný na povrchu buněk a označuje tak buňky určené k odstranění (Itoh et al., 1991).

Apoptický proces zabezpečuje odstranění poškozených, nezralých či stárnoucích buněk. Poškozené spermatické buňky jsou odstraňovány ze semenných kanálků dospělých jedinců i během samotného vývoje. Zabraňuje se tak výskytu spermií s poškozenou DNA v ejakulátu.

Během spermatogeneze je apoptóza důležitá pro udržování rovnováhy mezi zárodečnými a Sertoliho buňkami ve varlatech (Rodriguez et al., 1997). Poškozením procesu apoptózy je narušena i tato rovnováha, do ejakulátu se dostávají abnormální mužské gamety a dochází tak k poruchám mužské plodnosti. Zárodečné buňky, které měly být původně odstraněny tak unikají apoptóze, diferencují se ve zralé spermie a hromadí se v ejakulátu.

3.2 Defekty tkání a buněk

Existují různé genetické a anatomické defekty, které souvisí s tvorbou poškození DNA spermií. Mezi ty anatomické patří varikokéla neboli rozšířené žíly v šourku. Dochází tak k rozšíření žilní pletně, která vede krev z varlat do břicha. Byla prokázána korelace této vady s vyšším výskytem poškozené DNA, a to na základě porovnání s jedinci bez varikokély (Smith et al., 2006). Je možné podstoupit operaci varikokély, varikokélektomii. Studie prokázaly, že tato operace pak umožňuje celkové snížení fragmentace DNA spermií, a tím pádem i vylepšení jejich parametrů (Telli et al., 2015). Chirurgické odstranění pletenců tak vede ke zlepšení kvality spermií v podobě jejich pohyblivosti, koncentrace a morfologie (Telli et al., 2015).

K poškození DNA přispívají i chromozomové abnormality. Velmi častá je aneuploidie, tedy abnormální počet chromozomů, kdy chromozom může chybět (monozomie) nebo naopak přebývat (trizomie). Byla prokázána korelace mezi přítomností aneuploidie a poškozené DNA spermií (Arumugam et al., 2019). Výskyt aneuploidie během procesu zrání spermií totiž vede k fragmentaci DNA, jakožto výsledku mechanismu určeného k inaktivaci defektního jaderného genomu (Muriel et al., 2007).

3.3 Vnější příčiny

3.3.1 Věk

Pokročilý otcovský věk je spojován s různými reprodukčními riziky, a to především u mužů ve věku čtyřicet a více let. Při porovnání indexu fragmentace DNA skupiny mužů mladších 30 let se skupinou mužů starších 50 let, bylo potvrzeno vzrůstající procento poškození DNA se zvyšujícím se věkem (Moskovtsev et al., 2009). K hromadění poškození dochází v důsledku nedostatečně fungující apoptózy. Bylo potvrzeno, že s vyšším věkem jsou buňky méně schopné opravovat vlastní poškození DNA (Singh et al., 2003). Navíc, jak již bylo zmíněno, s věkem se rovněž zvyšuje i pravděpodobnost oxidativního stresu.

3.3.2 Léčba rakoviny

Léčba rakoviny v podobě ozařování a chemoterapie s sebou nese i negativní účinky, jako je riziko narušení plodnosti. Během chemoterapie jsou podávány léky, které se dostávají krevní cestou do celého těla a mohou tak ovlivnit nejen rakovinné, ale i další buňky, včetně spermií. Chemoterapie během onemocnění rakoviny varlat nemá vliv na počet spermií v ejakulátu, ale koreluje s výskytem vyššího procenta spermií s fragmentovanou DNA, a to i přesto, že po chemoterapii došlo ke zlepšení stavu kondenzace chromatinu (Spermon et al., 2006). V případě využití radioterapie dochází rovněž k poškození spermií, a to v důsledku vystavení buněk vysokoenergetickému záření, které vede ke snížení objemu ejakulátu, sníženému počtu a koncentraci spermií, případně narušení jejich pohyblivosti či morfologie (Gandini et al., 2006). Narušena může být i spermatická DNA, kdy míra fragmentace odpovídá konkrétní dávce záření (Paoli et al., 2015). Nižší dávka ozařování umožňuje pozdější obnovení a poškození je tak pouze dočasné. Míra poškození DNA po léčbě je tedy závislá na intenzitě terapie, ale i na konkrétním stádiu onemocnění (Paoli et al., 2015).

3.3.3 Životní styl

Faktory životního stylu jedince mohou rovněž přispívat ke vzniku fragmentace spermatické DNA. Stravovací návyky jsou jedním z těchto faktorů. Bylo potvrzeno, že kvalita spermatu je negativně ovlivněna u mužů, kteří často konzumují zpracované červené maso, tučné a mléčné výrobky, sladkosti, energetické nápoje či rafinované obiloviny (Jurewicz et al., 2018).

Negativní dopad na kvalitu spermatických buněk může mít i kouření cigaret. Konkrétně byla potvrzena korelace nejen s poškozením spermatické DNA, ale i s dalšími funkčními parametry, jako je progresivní a celková motilita, životaschopnost či morfologie spermií (Mostafa et al., 2018). Úroveň poškození pak souvisela s tím, jak dlouho konkrétní pacient kouří a zároveň i s množstvím vykouřených cigaret za den (Mostafa et al., 2018).

Dalším z faktorů je vystavení znečištěnému či dokonce toxickému prostředí. Studie zabývající se vznikem poškození v souvislosti se znečištěným prostředím byla provedena na mužích v České republice, konkrétně žijících v městě Teplice, kteří jsou sezónně vystavováni znečištěnému ovzduší (Selevan et al., 2000). Tato studie prokázala, že období zvýšeného znečištění bylo spojeno s abnormalitami chromatinu společně s poklesem počtu pohyblivých spermií s normální morfologií.

4 Metody detekce fragmentované DNA spermií

Integrita DNA spermií je zásadní pro správný průběh přenosu genetického materiálu spermie do oocyty během procesu oplození. Spermie s fragmentovanou DNA mají menší šanci oplodnit vajíčko a v případě oplození mohou vést k vyššímu riziku potratu (Henkel et al., 2004). Význam genetické integrity spermií ve spojitosti s reprodukčními výsledky byl prokázán studií, která potvrzuje přítomnost vysokých hladin SDF (fragmentace DNA spermií) u neplodných mužů v porovnání s plodnými muži (Santi et al., 2018). Z této studie lze vyvodit, že SDF je možné použít jako marker pro vyšetření mužské neplodnosti a přidat tak doplňující informace ke standardním analýzám spermatu. V klinické praxi je pro hodnocení kvality spermatu běžně používán spermioqram, během kterého jsou hodnoceny různé parametry spermií. Analýza výsledků je pak umožněna na základě hraničních hodnot (viz *Tabulka 1*), které stanovila WHO (WHO, 2021)

OBJEM EJAKULÁTU	min. 1,4 ml
CELKOVÝ POČET SPERMÍÍ	min. 39 mil
KONCENTRACE SPERMÍÍ	min. 16 mil/ml
PROGRESIVNÍ POHYB	min. 30 %
CELKOVÁ POHYBLIVOST	min. 42 %
MORFOLOGICKY NORMÁLNÍ FORMY	min. 4 %
VITALITA	min. 54 %

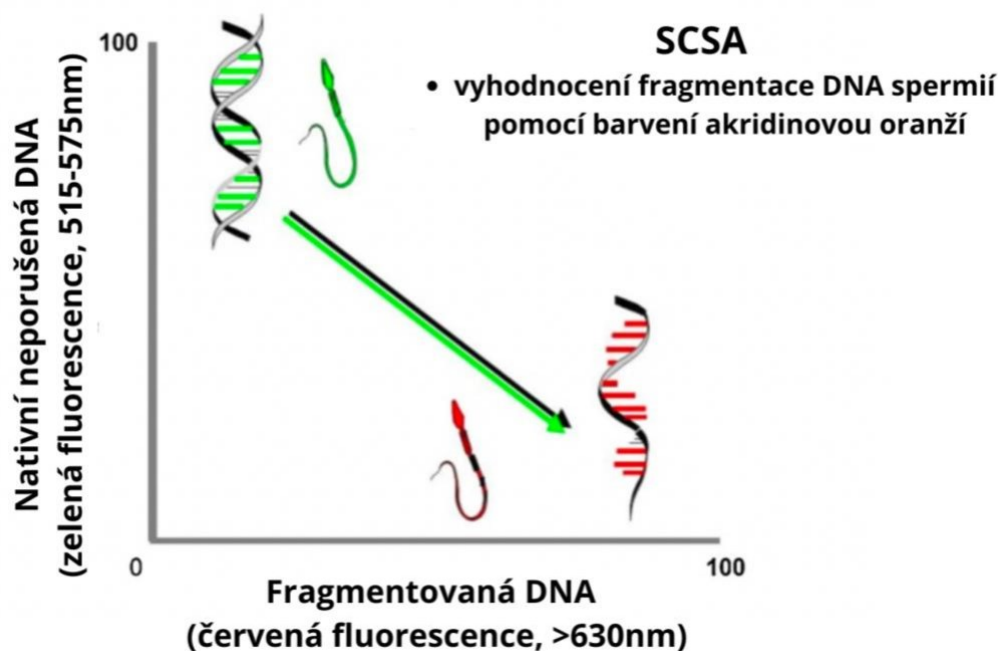
Tabulka 1: Doporučené normy dle WHO 2021 (vlastní zpracování)

Pro detekci fragmentace DNA spermií bylo popsáno hned několik metod. Ty se pak liší nejen provedením, ale i detekcí typu poškození. Každý z testů má navíc své specifické hraniční hodnoty, které udávají hranici mezi normálními výsledky a výsledky, které vedou k potížím během reprodukce.

4.1 Metoda SCSA (Sperm Chromatin Structure Analysis)

Test SCSA byl popsán již roku 1980 (Evenson et al., 1980) a stal se tak prvním průkopovým testem pro detekci fragmentace DNA spermií. Až později se začaly používat i jiné metody (viz níže). SCSA slouží k analýze struktury chromatinu spermií. Samotný princip testu spočívá v detekci poškozené DNA za pomoci slabého roztoku kyseliny, akridinové oranže (AO) a následné analýzy obarvených spermií průtokovým cytometrem (Evenson, 2022).

Nejprve je vzorek spermatu ošetřen kyselým puftrem o pH 1,20 (Evenson, 2022), což vede k otevření vlákna DNA v místě zlomu a vzniká tak prostor pro vazbu specifického barviva. Nativní dvouřetězcová DNA je poměrně stabilní a odolná vůči kyselinám. Naopak chromatinová struktura poškozené DNA spermie je poměrně volná a působením kyselé látky dochází k denaturaci na jeden řetězec. Po denaturaci je DNA spermií obarvena speciálním fluorescenčním barvivem, tím je výše zmiňovaná AO, která se váže mezi vlákna DNA. Váže se jak na ssDNA (jednovláknová DNA) tak na dsDNA (dvouvláknová DNA). Následně je měřena fluorescence jednotlivých spermií pomocí fluorescenčního či průtokového cytometru (Evenson et al., 1980). Nefragmentovaný vzorek je po excitaci modrým světlem (488nm) vizualizován pomocí zelené fluorescence o vlnové délce 515–575 nm (Darżynkiewicz et al., 1975). Naopak fragmentovaná DNA emituje v červeném světle o vlnové délce větší než 630 nm (*Obrázek 2*). Vyhodnocení testu je pak umožněno pomocí počítačového programu, který vygeneruje přehledné grafy (Evenson, 2022).



Obrázek 2: SCSA vyhodnocení SDF pomocí barvení AO – schéma změny barvy fluorescence ze zelené (neporušená DNA) na červenou (fragmentovaná DNA).
(převzato a upraveno: Evenson, 2016)

Důležitý je pak index fragmentace DNA (DFI), tedy poměr červeně fluoreskující části ve vzorku, jehož hodnota přesahující hranici 30 % odpovídá vyššímu riziku problémů s plodností (Bungum et al., 2007). Současně je měřeno i procento HDS (z angl. High DNA Stainability), které odpovídá spermii s vyšší úrovní zelené fluorescence, tedy těm, u kterých je detekováno zvýšené množství jaderných histonů oproti protaminům a dochází tak k abnormalitám ve struktuře chromatinu (Evenson, 2022). Jak již bylo zmíněno v kapitole o spermatogenezi, výměna histonů za protaminy je zásadní pro vytvoření odolné struktury chromatinu, která zabezpečuje správný průběh procesu oplození a následného těhotenství. U spermii s vysokým procentem HDS je tato výměna narušena, spermie jsou považované za nezralé a po přesažení 15 % hodnoty HDS je po oplození těmito spermii prokázáno zvýšené riziko potratu (Jerre et al., 2019).

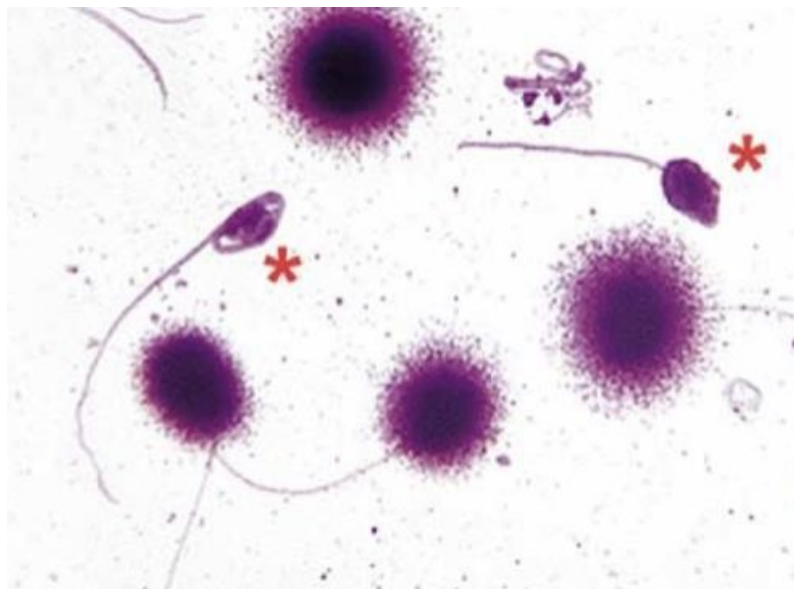
Vyhodnocení metody SCSA je možné pomocí fluorescenčního, ale především průtokového cytometru (FC, z angl. Flow Cytometry), který je pro své výhody používán daleko častěji. Test je díky analýze vzorků pomocí FC vysoce výkonný a lze ho provést s větším počtem buněk již během několika málo minut (Evenson, 2022). Je možné testovat čerstvé i zmrazené vzorky spermatu. SCSA je také jako jediná metoda používána vždy stejným

způsobem, na rozdíl od ostatních testů, které mohou mít více variant a jsou jim věnovány následující kapitoly (Evenson, 2016). Výhodou metody je také vysoká srovnatelnost výsledků z různých laboratoří (Javed et al., 2019). Naopak nevýhodou je menší prediktivní síla této metody (Javed et al., 2019) či vyšší cena přístrojového vybavení v podobě FC. Průtokový cytometr je sice drahý, na druhou stranu náklady na potřebná činidla jsou pro tuto metodu v porovnání s ostatními testy nižší (Evenson, 2022).

4.2 SCD (Sperm Chromatin Dispersion test)

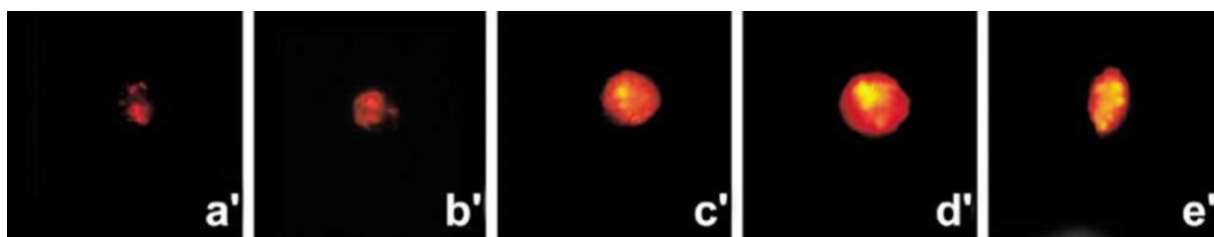
Test disperze chromatinu spermií, také známý jako Halo test, byl poprvé popsán v roce 2003 (Fernández et al., 2003). Na základě tohoto popisu byl vytvořen vylepšený set Halosperm pro hodnocení lidských spermií. Tento nový SCD protokol je oproti tomu původnímu méně agresivní a umožňuje tak lepší zachování hustoty chromatinu a následné pozorování pod světelným mikroskopem (Fernández et al., 2005). Dalším zdokonalením jsou zachované bičíky spermií, které umožňují odlišení spermatických buněk od jiných typů buněk (Fernández et al., 2005).

Hlavním principem je detekce nepoškozených spermií, čímž se tato metoda liší od jiných testů. Nefragmentované spermie mají rozptýlené smyčky DNA okolo jádra, pozorujeme u nich tzv. halo efekt (*Obrázek 3*).



Obrázek 3: Ukázka neporušených spermií s halo efektem a spermií s fragmentací DNA bez halo efektu, které jsou označeny hvězdičkou (převzato: Fernández et al., 2005)

Naopak spermie s fragmentovanou DNA mají nerozptýlený chromatin, což bylo potvrzeno pomocí testu DBD-FISH (DNA Breakage Detection-Fluorescence In Situ Hybridization) (Fernández et al., 2003), a tudíž u nich není efekt halo patrný. DBD-FISH je proces umožňující detekci ssDNA motivů, a to za pomoci hybridizace DNA sond (Fernández & Gosálvez, 2002). Nepoškozené spermie tak vykazují nízké až nedetekovatelné značení DBD-FISH, naopak velmi silné značení DBD-FISH (viz Obrázek 4) odpovídá jádrům spermií s rozsáhlou fragmentací (Fernández et al., 2003).



Obrázek 4: Barvení spermatické DNA pomocí DBD-FISH (převzato: Fernández et al., 2005)

a') halo efekt b') středně velký halo efekt c') malý halo efekt d') bez halo efektu
e') bez halo efektu + degradace

Jako první je během metody SCD nanesen nefixovaný vzorek čerstvého či zmraženého spermatu na podložní sklo společně s agarózou. SCD patří mezi nepřímé testy, proto je potřeba denaturace pomocí kyseliny pro umožnění přístupu ke šroubovici DNA a její možné analýzy. Po ošetření připraveného vzorku kyselinou dochází k denuraci DNA, dvoušroubovice se rozpouští a tvoří se ssDNA molekuly. Denaturace je poté pozastavena a následuje odstranění jaderných proteinů, které zabezpečuje lyzační roztok. Pro pozorování jsou pak buňky barveny pomocí barviva DAPI (4',6-diamidin-2-fenylindol), které barví oblasti v DNA bohaté na adenin-thymin nebo pomocí činidla Diff-Quick (Differential Quick staining kit) (Fernández et al., 2003). Diff-Quick je dle WHO často používáno při analýze morfologie spermií, protože zvýrazňuje strukturu spermatické hlavičky a bičíku (WHO, 2021). Vyhodnocení přítomnosti rozptýleného či nerozptýleného chromatinu je pak možné za pomoci fluorescenčního, ale i obyčejného světelného mikroskopu. Pozorována je nepoškozená DNA, která je zbavena jaderných proteinů. Jsou zde patrné rozptýlené smyčky DNA okolo jádra spermií, které vytváří halo efekt. Ta poškozená má nerozptýlený chromatin a halo efekt je zde minimální, či není vůbec patrný (Fernández et al., 2003).

Test SCD je používán pro jeho jednoduchost, přesnost a vysokou reprodukovatelnost (Fernández et al., 2005). Testovací soupravy SCD jsou vyráběné na zakázku, existuje tedy

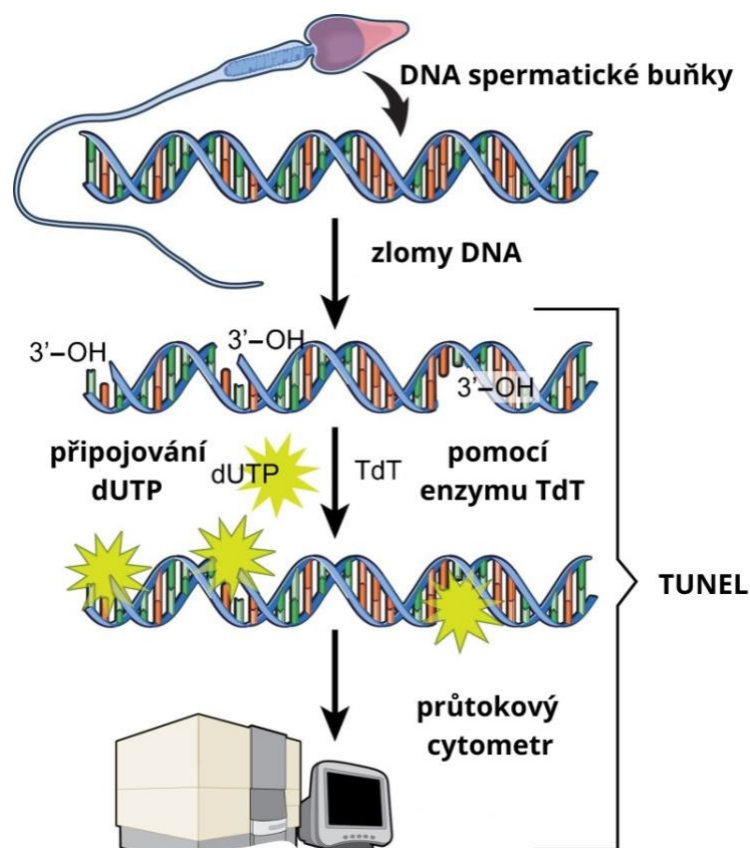
mnoho variant tohoto testu (Evenson, 2016), které se pak liší nejenom použitím pro specifický organismus, ale i hraničními hodnotami pro pozitivní či negativní výsledek (Vidya Laxme et al., 2020). Tím se SCD liší od metody SCSA, která má pouze jednu variantu. Dalším rozdílem je také vyšší prediktivní síla SCD oproti testu SCSA (Javed et al., 2019). Pro pozorování není rozhodující intenzita barvy či fluorescence, proto je jeho vyhodnocení jednoduše možné za pomoci světelného mikroskopu. Hlavní výhodou hodnocení fragmentace DNA metodou SCD představuje nízká cena. Navíc metoda nevyžaduje použití speciálního či složitějšího přístrojového vybavení, proto může být test proveden s běžně dostupnými nástroji téměř ve všech andrologických laboratořích (Fernández et al., 2003). Vyhodnocení však závisí na zkušenostech techniků (Vidya Laxme et al., 2020), což pak může vést k odchylkám ve výsledcích. Konkrétní rozdíl v odhadovaném podílu spermií s fragmentovanou DNA se u různých techniků může pohybovat v rozmezí 6-12 % (Fernández et al., 2005).

Vylepšení protokol SCD je tedy jednoduchý, levný, rychlý a reprodukovatelný. Právě z těchto důvodů by mohla být metoda SCD považována za vhodnou pro rutinní diagnostiku.

4.3 TUNEL (Terminal deoxynucleotidyl transferase mediated dUTP Nick End Labeling)

Metoda TUNEL byla poprvé popsána v 90. letech 20. století (Gavrieli et al., 1992) a je další z běžně používaných laboratorních technik detekujících SDF. TUNEL umožňuje vyhodnocení jak čerstvého, tak zmraženého vzorku spermatu (Sharma et al., 2013). Využívá se především pro detekci apoptotické fragmentace DNA, detekuje tedy zlomy, vznikající během procesu buněčné smrti (kapitola 3.1.3 *Neúspěšná apoptóza*).

Průběh testu TUNEL, který zobrazuje *Obrázek 5*, je založen na přidávání značených nukleotidů na volné konce DNA řetězcových zlomů za pomoci enzymaticky katalyzované reakce. Značeny jsou ssDNA i dsDNA zlomy (Robbins & Coleman, 1988). Samotné značení zprostředkovává enzym terminální deoxynukleotidová transferáza (TdT) a to nezávisle na templátu (Robbins & Coleman, 1988). Na volné 3'-hydroxylové konce fragmentů DNA jsou pomocí TdT přidávány značené deoxynukleotidy, nejčastěji deoxyuridintrifosfát dUTP (WHO, 2021). Volné konce tedy slouží jako primery pro přidávání dUTP. (Sharma et al., 2013).



Obrázek 5: Schéma metody TUNEL (převzato a upraveno: Sharma et al., 2016)

Soupravy pro značení pomocí TUNEL jsou snadno dostupné v rámci komerčního trhu (Sharma et al., 2013). Nukleotidy mohou být značeny pomocí fluorochromů, nejčastěji pomocí fluorescein isothiokyanátu (FITC) (Sharma et al., 2013), pomocí bromu nebo za pomoci biotinových sond. Biotinové sondy se pak používají společně se streptavidinem konjugovaným s křenuvou peroxidázou (HRP, z angl. Horse Radish Peroxidase) a chromogenním substrátem pro HRP (WHO, 2021). Přidané nukleotidy tak mohou být značeny buď přímo pomocí fluoresceinu nebo nepřímo pomocí protilátek proti konkrétním markerům či pomocí streptavidinu, který se váže na biotinem značené dUTP (Ribeiro et al., 2017). K nepřímým variantám patří i značení dUTP pomocí bromu (BrdUTP). Toto značení je pak identifikováno pomocí protilátky anti-BrdUTP, která může být dále kovalentně vázána na fluorescein. Po porovnání přímého a nepřímého značení bylo zjištěno, že značení založené na protilátkách výrazně podhodnocuje hodnotu SDF, a to zejména u neplodných pacientů se sníženou pohyblivostí spermií, a tudíž tato souprava není vhodná pro vyhodnocení procenta SDF (Ribeiro et al., 2017). Pro zviditelnění struktury spermií při pozorování se aplikuje barvivo DAPI či propidium jodid, které obarví jádra spermií, což umožňuje odlišit spermatické buňky

od jiných struktur. Pro odhalení sond značených biotinem je důležitý streptavidin konjugovaný s HRP a chromogenní substrát (WHO, 2021).

Pro analýzu značených zlomů je pak možné využít světelný mikroskop, fluorescenční mikroskop, ale stejně jako v případě metody SCSA je především využívána FC. Ta představuje společnou výhodu testu TUNEL a SCSA, díky čemuž je možné pozorovat velké množství spermií za krátký čas. Je tedy možné rychlé a přesné vyhodnocení vzorků spermatu. Spearmanova korelační analýza potvrdila, že výsledky pro SDF těchto dvou testů spolu korelují (Javed et al., 2019), což bude dále popsáno v kapitole 5 *Testování v klinické praxi*. Cena metody TUNEL je oproti jiným SDF testům vyšší, a to především v kombinaci s FC. Nevýhodou je nedostatečná standardizace, kdy drobné technické odchylky, jako je koncentrace fixačního činidla, doba uchování fixovaných vzorků před analýzou či typ použitého značení zlomů mohou vést k odchylkám v rámci množství přítomného poškození a komplikuje se tak porovnávání výsledků v rámci laboratoří (Muratori et al., 2010).

4.4 ISNT (In Situ Nick Translation)

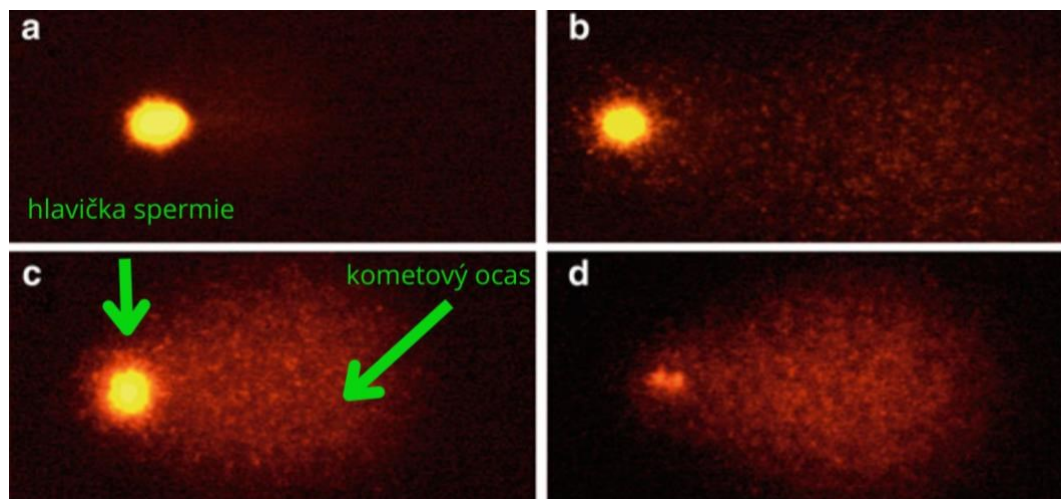
ISNT je poměrně jednoduchý a cenově dostupný test. Metoda byla popsána za účelem rozpoznání jednořetězcových zlomů DNA ve fixovaných savčích buňkách (Iseki & Mori, 1985). Je prováděna *in situ* a nepoškozuje tak morfologii buněk (Iseki & Mori, 1985). Hlavním principem této metody je inkorporace biotinylovaného dUTP do jednořetězcových zlomů DNA. Značené nukleotidy jsou pak detekované pomocí streptavidinu konjugovaného s alkalickou fosfátázou (Sumner et al., 1990) a pro vyhodnocení je potřeba pouze světelný mikroskop (Iseki & Mori, 1985). Oproti jiným testům je tato metoda méně citlivá. Často je však díky své vzájemné podobnosti srovnávána s testem TUNEL. Obě metody jsou založené na inkorporaci značených nukleotidů na 3'-hydroxylové konce fragmentů DNA. V obou případech je inkorporace řízena enzymaticky. Oproti TUNEL, kde je připojování nukleotidů řízeno nezávisle na templátu, je u ISNT generováno připojení DNA polymerázou 1, což je naopak enzym na templátu závislý. DNA zralé spermatické buňky je díky protaminaci vysoce kondenzovaná, jak je popsáno v kapitole 2 *Spermatogeneze*. Dle studií se předpokládá, že pro vyšší účinnost testu ISNT je zásadní dekondezace chromatinu, která usnadňuje přístup DNA polymerázy k DNA a umožňuje tak efektivnější detekci poškození (Twigg et al., 1998). Za pomoci ISNT je stejně jako v případě metody TUNEL možné hodnocení poškození DNA na úrovni jediné buňky (Gold et al., 1993). Detekovány jsou pak pouze ssDNA zlomy, na rozdíl od TUNEL, která detekuje také dsDNA zlomy.

4.5 SCGE (Single Cell Gel Electrophoresis)

Jednobuněčná gelová elektroforéza (SCGE), jinde také pod názvem kometová analýza (comet assay), je schopna detekovat poškození DNA, a to na úrovni jednotlivých buněk. SCGE byla popsána již v roce 1984 (Ostling & Johanson, 1984). Metodu je možné použít ve dvou variantách, za neutrálních nebo za alkalických podmínek. Během neutrální SCGE nedochází k denuraci dvoušroubovice DNA, a proto je tato varianta schopna detekovat pouze dsDNA zlomy. Později došlo k modifikaci této metody, a to použitím elektroforézy za alkalických podmínek (Singh et al., 1988). Během těchto podmínek dochází k denuraci a následnému rozvláknění DNA v prostředí okolo pH 13. Alkalická SCGE je tedy citlivější a je schopna detekovat ssDNA i dsDNA zlomy. Zároveň detekuje AP (apurinová/apyrimidinová) místa, která jsou „alkali-labilní“ a jsou tak citlivá k alkalickému prostředí, ve kterém se mohou přeměnit na zlomy DNA a jsou tak detekovány pomocí SCGE (Speit & Rothfuss, 2012).

Během testování metodou SCGE jsou nejprve jednotlivé spermatické buňky fixovány do agarózového gelu na mikroskopickém sklíčku. Následně jsou buňky lyzovány, a to za použití detergentu (1% lauroylsarkosinát sodný a 1% Triton X-100) v podmínkách vysokého obsahu solí (Singh et al., 1988). Lýze vede k odstranění jaderných proteinů, tedy protaminů a histonů a následnému vzniku struktury podobné nukleoidu (Simon & Carrell, 2013). Dvoušroubovice DNA je rozpletena a následně je aplikováno slabé elektrické pole. Elektroforéza umožňuje migraci poškozených vláken DNA směrem k anodě, tedy směrem od jádra (Singh et al., 1988). Výsledný obraz pak připomíná kometu se zřetelnou hlavou a ocasem. Právě odtud pochází samotný název kometová analýza. Neporušená DNA zůstává v takzvaném centru (Ostling & Johanson, 1984), tedy ve zmiňované hlavové části komety. Kometový ocas je pak tvořen poškozenou DNA a jeho délka odráží míru poškození (Collins et al., 1995). Před samotným pozorováním jsou fragmenty DNA ještě barveny specifickým fluorescenčním barvivem. Tím může být akridinová oranž (Ostling & Johanson, 1984), propidium jodid, SYBR Green I (Enciso et al., 2009), DAPI (Collins et al., 1995) nebo ethidium bromid (Singh et al., 1988). Obarvené struktury jsou pak pozorovány a vizuálně hodnoceny přes fluorescenční mikroskop. Komety lze pak rozdělit do skupin v rozmezí čísel 0 až 4, tedy od nepoškozených po ty nejvíce poškozené (Collins et al., 1995). Vizuální hodnocení je však nepraktické vzhledem k variabilitě pozorovatelů. Proto jsou pro analýzu parametrů komety využívány specializované počítačové programy, například CASP (z angl. Comet Assay Software Project). Analyzována je intenzita fluorescence v rámci hlavičky i ocasu, ale také délka samotného ocasu. Platí, že čím delší je kometový chvost, tím bude větší i rozsah samotného poškození (*Obrázek 6*) (Enciso et al.,

2009). Množství DNA obsažené v částech komety je patrné na intenzitě fluorescence (Simon & Carrell, 2013). Jako měřítko úrovně poškození DNA pak slouží relativní fluorescence kometového ocasu v porovnání s hlavou (Simon & Carrell, 2013).



Obrázek 6: Výsledky alkalického kometového testu, znázorňující komety se vzrůstajícím poškozením: a) bez poškození b) 12% poškození c) 45% poškození d) 95% poškození (převzato a upraveno: Simon & Carrell, 2013)

Původní verze kometového testu je schopna detekovat pouze řetězcové zlomy. Aby bylo možné měřit i jiné druhy poškození DNA, je původní protokol často modifikován. Modifikace může být pomocí opravných enzymů. Buňky jsou ošetřeny enzymy ještě před použitím elektroforézy. Ty odstraní modifikovanou bázi a zanechávají po sobě řetězcový zlom, který je následně detekován kometovým testem. Tímto způsobem lze detekovat oxidované báze DNA za pomoci endonukleázy III (Collins et al., 1993). Většina existujících metod pro detekci SDF není schopno rozlišit ssDNA a dsDNA zlomy v rámci jedné spermatické buňky. Modifikovaný dvojrozměrný kometový test umožňuje kombinaci neutrálních a alkalických podmínek a je tohoto rozlišení schopen (Enciso et al., 2009). Během této studie byla potvrzena přítomnost vyšší hladiny dsDNA zlomů u neplodných pacientů. Oba typy zlomů se mohou vyskytovat v různém množství v rámci jedné buňky. Rozlišení typu daného zlomu je důležité z hlediska informací o rozsahu a povaze celkového poškození, ale i následného dopadu na průběh oplození. Dvouvláknové zlomy jsou považované za závažnější, mohou vést k rozsáhlým chromozomálním přestavbám (Aparicio et al., 2014). Jejich oprava oocytem je daleko složitější, než oprava jednovláknových zlomů (Enciso et al., 2009), a tudíž se liší jejich dopad na celkový fertilizační potenciál. Dle současných poznatků byl potvrzen vyšší negativní dopad dsDNA zlomů na výsledky reprodukce oproti ssDNA zlomům (Agarwal et al., 2020*). Pokud tedy díky

tomuto rozlišení získáme bližší informace o daném poškození (typ, původ), lze předpokládat, že získáme i důležité informace pro následný postup při léčbě či výběru techniky asistované reprodukce.

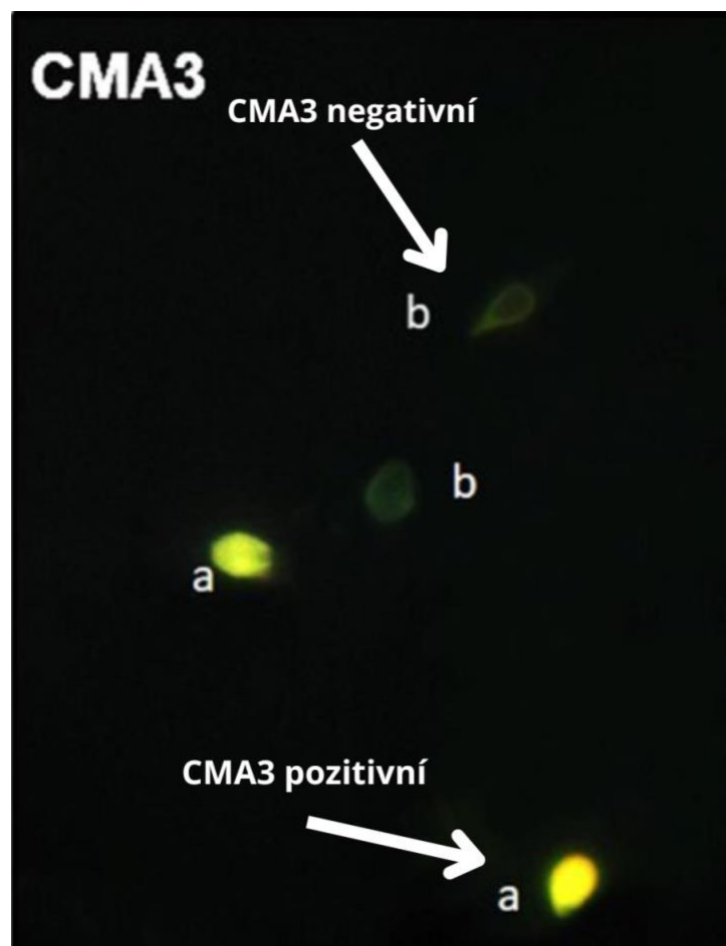
SCGE je poměrně levnou a rychlou metodou. Pro samotnou analýzu stačí pouze malé množství buněk, a tudíž je možné SCGE využít u mužů s nižším počtem spermií (Ostling & Johanson, 1984) . Díky své vysoké citlivosti se kometová analýza využívá v široké škále různých studií. Například v lidském biomonitoringu, kdy jsou testováni jedinci, žijící či pracující ve znečištěném prostředí (Etebari et al., 2014), případně v rámci výzkumu rakoviny a lidských nádorů (Kopjar et al., 2006) nebo v genotoxikologii, především pro testování léků (Lima et al., 2010). Dle WHO není SCGE pro některé laboratoře vhodná v rámci klinické praxe. Problémem je nedostatečná standardizace této metody a tím pádem i porovnání výsledků mezi laboratořemi (WHO, 2021), kdy zde hraje roli lidský faktor. Kometová analýza zahrnuje více metodických kroků a pro interpretaci výsledků je potřeba odborná znalost (WHO, 2021). SCGE může také podhodnocovat skutečnou frekvenci zlomů DNA, a to například v důsledku překrývajících se migrujících fragmentů či přítomnosti příliš malých fragmentů (Olive et al., 2001). Z těchto informací je patrné, že výsledné procento poškození pak může být pouze přibližné.

4.6 Techniky barvení pro hodnocení struktury chromatinu

4.6.1 Barvení chromomycinem A3 (CMA3)

CMA3 je fluorescenční barvivo, které je schopné se vázat na nukleové kyseliny. Konkrétně se váže na malý žlábek DNA šroubovice, tedy na stejném místě jako protaminy. CMA3 je specifické pro sekvence DNA bohaté na GC (guanin-cytosin) páry. V roce 1993 byla představena studie, která se zabývala použitím barvení CMA3 pro hodnocení struktury chromatinu a fragmentace DNA spermií (Bianchi et al., 1993). Tato studie vede k závěru, že barvení pomocí CMA3 lze použít jako užitečnou metodu pro detekci nedostatku protaminu v chromatinu spermií. V rámci této studie bylo detekováno velké procento lidských spermií, které byly pozitivní na barvení CMA3. Avšak přístupnost barviva ke spermatické DNA byla znemožněna přidáním protaminu na sklíčka s připraveným preparátem spermií. Z toho lze vyvodit, že k samotnému poškození struktury chromatinu, může docházet již během výměny histonů za protaminy (viz kapitola 2 *Spermatogeneze*). Ve zralé spermii najdeme vysoce kondenzovanou DNA, což je dáno právě protaminy. Barvení CMA3 je tedy používáno pro hodnocení kvality sbalení chromatinu, ale také pro detekci absence protaminů. Tato metoda je

levná a také poměrně jednoduchá. Po obarvení jsou vzorky hodnoceny pomocí fluorescenčního mikroskopu, kdy jsou počítány pozitivně značené buňky CMA3, které fluoreskují (Obrázek 7). Jasnější žlutá fluorescence o vlnové délce 575 nm, která je patrná po excitaci světlem s vlnovou délkou 445 nm, odráží vyšší úroveň poškození, tedy nedostatek protaminu a abnormální balení chromatinu. Vyhodnocení testu opět závisí na pozorovateli (WHO, 2021), což může představovat nevýhodu, jelikož pozorovatelé mohou mít různé zkušenosti a celkové výsledky se tak mohou lišit. Proto je důležitá standardizace pro minimalizaci rozdílů. Procento obarvených spermií lze hodnotit v rámci celého vzorku spermatu nebo ve spermiích selektovaných metodou „swim-up“ (WHO, 2021). Metodu barvení CMA3 je možné využít i v kombinaci s barvením anilinovou modří.



Obrázek 7: Barvení chromomycinem A3 (CMA3)
a) spermie s poškozeným chromatinem b) spermie bez poškození (převzato a upraveno: WHO, 2021)

4.6.2 Barvení toluidinovou modří

Barvení toluidinovou modří představuje další možnost pro posouzení struktury chromatinu. Toluidinová modř se váže na poškozený chromatin, a to konkrétně na místa fosfátových zbytků DNA. Analýza je možná pomocí běžného světelného mikroskopu. Jako tmavě fialové jsou pak viditelné spermie s poškozeným chromatinem. Chromatinová struktura je rozvolněná, fosfátové zbytky jsou tak přístupné pro navázání barviva (Sasikumar & Dakshayani, 2013), které tak může barvit intenzivněji a je patrné fialové zbarvení. Modrá barva pak odpovídá buňkám s vysoce zabaleným chromatinem, které jsou méně barvitelné. Stejně jako v případě barvení CMA3 i zde může být nevýhodou lidský faktor, tedy variabilita mezi pozorovateli (Li et al., 2019). Dle studií byla zjištěna korelace výsledků barvení toluidinovou a anilinovou modří, což poukazuje na jejich vysokou citlivost pro detekci poškození (Erenpreiss et al., 2001).

4.6.3 Barvení anilinovou modří

Anilinová modř je dalším barvivem, které umožňuje posouzení struktury chromatinu. Pozorován je stupeň dekondezace jader, což je obecně spojováno s nezralostí spermií. Anilin je kyselé barvivo, které se váže na histony, konkrétně na jejich lyzinové zbytky. Tato metoda se řadí mezi ty jednoduché a finančně dostupné. Pro vyhodnocení je stejně jako u toluidinové modře potřeba světelný mikroskop. Spermatické hlavičky s narušenou integritou chromatinu jsou pak viditelně modré, oproti těm nepoškozeným, které jsou bezbarvé (Erenpreiss et al., 2001). Obarvené spermie mohou pak být hodnoceny v rámci celého vzorku spermatu, nebo ve vybraných spermiích selektovaných pomocí metody „swim-up“ nebo na základě hustotního gradientu (WHO, 2021). Intenzita zbarvení tedy odráží kvalitu sbalení chromatinu. V jádře modře zbarvených spermií tedy převažují histony, a to v důsledku chyby během výměny histonů za protaminy. Metoda detekce tohoto defektu poskytuje důležité informace o zralosti spermií a integritě DNA, což je pak cenným parametrem v hodnocení potenciálu mužské plodnosti (Hammadeh et al., 2001). Barvení anilinovou modří bylo prokázáno jako užitečným ukazatelem v těhotenství u párů podstupujících IUI (intrauterinní inseminace) (Irez et al., 2018). Korelace výsledků tohoto testu s dalšími parametry spermií (morfologie, pohyblivost) je však sporná, jelikož bylo modré barvení zaznamenáno i ve spojení s normálními parametry (Kazerooni et al., 2009).

5 Testování v klinické praxi

V klinické praxi je běžné vyšetření spermatu prováděno především pomocí spermiogramu (kapitola 4 *Metody detekce fragmentované DNA spermií*). Někteří odborníci doporučují k těmto běžným analýzám i zařazení analýzy DNA (Majzoub et al., 2017, Colpi et al., 2018), která pak poskytuje specifitější informace o šanci páru na přirozené těhotenství a může napomáhat výběru metody asistované reprodukce. Naopak některé asociace, jako je Americká urologická asociace (AUA) nebo Americká společnost pro reprodukční medicínu (ASRM), nedoporučují rutinní používání testování SDF v klinické praxi, i přesto, že uznávají význam tohoto testování u párů s opakovanými těhotenskými ztrátami (Schlegel et al., 2021). Zařazení rutinního testování SDF s sebou nese řadu překážek. Jednou z těch hlavních je nedostatečná standardizace protokolů. Je potřeba sjednocení a vytvoření jasně daných pokynů pro postup v klinické praxi. Doporučené postupy vedou k minimalizaci nesprávných kroků během hodnocení a léčby mužské neplodnosti, zdokonalují tak celkovou účinnost diagnostiky. Tyto pokyny byly poprvé popsány ve studii Agarwal et al. (2017) a slouží tak dodnes jako základ pro další rozšíření. Obecně je doporučováno testování SDF u párů s idiopatickou neplodností či opakovanými těhotenskými ztrátami, dále po neúspěšné asistované reprodukci, kdy jsou využívány techniky, jako je *in vitro* fertilizace (IVF), intracytoplazmatická injekce spermie (ICSI) nebo intrauterinní inseminace (IUI), u mužů s rizikovými faktory životního stylu (kouření, expozice toxickým látkám) či u mužů s varikokélou. Před samotným testováním je pak pro snížení hodnoty SDF doporučována ejakulační abstinence, nejčastěji po dobu 3 až 5 dní (Agarwal et al., 2023). Důležitost délky abstinence je však stále diskutována, jelikož bylo potvrzeno, že procento fragmentace DNA stoupá s rostoucí délkou abstinence a při přesažení 5denní hranice tak dochází k nárůstu poškození (Comar et al., 2017).

K překážkám, které brání zařazení rutinního testování SDF, dále patří rozdílné hraniční hodnoty mezi různými testy, problém s validací či přesností testů, ale i náklady za samotné testování (Majzoub et al., 2017). Testy se liší detekcí odlišných míst poškození a konkrétním postupem. Každá metoda má navíc své specifické hraniční hodnoty (*Tabulka 2*), a tím pádem i rozdílnou interpretaci, která je často nejednoznačná. Hraniční hodnoty by měly být hodnoceny individuálně podle konkrétního klinického scénáře u daného páru (Agarwal et al., 2017), neexistuje tedy jednotná hodnota, ze které by šlo jasně vycházet, což představuje další problém pro rutinní začlenění testů. Je důležité, aby se lékaři před samotným testováním seznámili s vlastnostmi daných testů, které jsou pro klinicky nejvíce používané testy specifikovány níže (*Tabulka 2*). V klinické praxi jsou nejčastěji používané metody TUNEL a SCSA, dále pak SCD

a minimálně kometová analýza společně s dalšími testy (Majzoub et al., 2017). To bylo potvrzeno odborníky z různých zemí v jedné z nejnovějších studií z loňského roku, kdy hlavní roli ve výběru metody hrála dostupnost, cena a přesnost testu (Agarwal et al., 2023). Výsledky těchto testů pak nejsou vždy nutně stejné, ale existuje mezi nimi dobrý korelační vztah (*Tabulka 2*) (Javed et al., 2019). Byly zjištěny vysoké korelace výsledků mezi SCD a SCSA ($r = 0,70$; $p < 0,001$), SCD a TUNEL ($r = 0,68$; $p < 0,001$), SCSA a TUNEL ($r = 0,77$; $p < 0,001$) (Javed et al., 2019). V rámci stejné studie pak alkalická kometová analýza prokázala mírnější korelaci s testy SCD, SCSA a TUNEL ($r = 0,59$; $r = 0,57$; $r = 0,72$; $p < 0,001$), což poukazuje na její vyšší citlivosti v predikci mužské neplodnosti v porovnání se zbylými testy. Naopak neutrální kometová analýza nevykazovala žádnou prediktivní sílu pro hodnocení mužské plodnosti. Tyto výsledky korelují se studií z roku 2013 (Ribas-Maynou et al., 2013).

Název metody	Hraniční hodnoty (%)	Senzitivita	Specifita	X
TUNEL	22,08	0,754	0,942	X
SCSA	19,90	0,594	0,872	X
SCD	24,74	0,734	0,920	X
Alkalická SCGE	48,47	0,840	0,918	X
Neutrální SCGE	36,37	0,996	0,319	X
Korelace výsledků	SCD + SCSA	SCD + TUNEL	SCSA + TUNEL	alkalická SCGE + SCD, SCSA, TUNEL
r	0,70	0,68	0,77	0,59; 0,57; 0,72

Tabulka 2: Charakteristiky klinicky nejvíce používaných testů

(převzato a upraveno: Javed et al., 2019)

Je důležité rozlišovat čemu výsledná procenta odpovídají. Značná odlišnost hraničních hodnot souvisí s tím, že různé testy podávají specifické informace, SCSA k procentu

fragmentovaných spermií ve vzorku navíc přidává hodnotu HDS a poskytuje tak bližší informace o poškození jednotlivých buněk. TUNEL a SCD uvádí procento, které odpovídá poměru poškozených spermií v rámci celého vzorku, naopak kometová analýza pak měří procento poškození v každé buňce (Singh et al., 1988). Konkrétní hodnota tedy v rámci každého testu odpovídá jinému výsledku.

K nejvíce standardizovaným testům patří metoda SCSA (Evenson, 2022), která se díky vyhodnocení pomocí FC řadí mezi rychlejší, avšak cenově vyšší metody. SCSA vykazuje vysokou schopnost opakovatelnosti s variačním koeficientem v rozmezí 1-3 % (Evenson, 2013), což poukazuje na spolehlivost tohoto testu. Naopak nevýhodou pro rutinní zařazení může být její složitost. Další, poměrně standardizovanou technikou je metoda TUNEL (Sharma et al., 2010). Potřeba standardizace je zde především díky tomu, že test vykazuje rozdíly ve výsledcích pro SDF v závislosti na změnách během postupu (Muratori et al., 2010). Pomocí TUNEL v kombinaci s FC dokáže vyhodnotit velké množství buněk za krátký čas, je tedy rychlou a přesnou metodou, avšak poměrně finančně náročnou. SCD je naopak levnou metodou, kdy pro vyhodnocení stačí pouze běžně dostupné laboratorní vybavení. Spolehlivost testu přesahuje hodnotu 0,80 (Esteves et al., 2022), což naznačuje, že test je reprodukovatelný. Potřeba standardizace SCD protokolu je především z důvodu, že vyhodnocení závisí na lidském faktoru, což může vést k rozdílům ve výsledcích (Fernández et al., 2005). Rozdíly mezi pozorovateli (kapitola 4.2 SCD) tak představují hlavní nedostatky této metody. Kometová analýza je díky své vysoké citlivosti (Javed et al., 2019) používána v různých oblastech výzkumu. Je možné ji aplikovat na malé množství buněk. V klinické praxi však představuje problém variabilita způsobená pozorovateli při vyhodnocení výsledků či existence řady modifikovaných protokolů. Dle doporučení WHO by měla být SCGE v dnešní době prováděna na základě standardizovaného protokolu z roku 2013 (Simon & Carrell, 2013).

Techniky barvení CMA3, toluidinovou a anilinovou modří umožňují hodnocení kvality chromatinu. Pro barvení pomocí CMA3 byla určena hraniční hodnota 31 %, a to společně se senzitivitou 74 % a specifitou 68 % (Zandemami et al., 2012). Vyšší hodnota než 31 % tedy poukazuje na nedostatek protaminu. I přes svou efektivitu a poměrně vysokou citlivost není CMA3 barvení vhodné pro klinickou praxi, a to především kvůli nedostatečné standardizaci. Dle WHO (2021) může dojít k aglutinaci spermií či tvorbě fluorescenčního pozadí, což pak komplikuje vyhodnocení výsledků. Navíc je skórování závislé na technikovi. Hraniční hodnota pro barvení toluidinovou modří byla stanovena na 45 %, společně s citlivostí o 42 % a specifitou o 92 % (Tsarev et al., 2009). Z těchto hodnot je patrné, že výsledky tohoto barvení jsou prediktivní pro neplodnost, ale nikoliv pro odhalení plodných jedinců. Jedinec, u kterého

výsledek testu přesáhl 45% hranici může být s vysokou specifikou diagnostikován jako neplodný, avšak nižší hranice nutně neznamená plodnost jedince. Z tohoto důvodu jsou v klinické praxi upřednostňovány specifitější a citlivější metody, jako je TUNEL, SCSA či SCD. Stejně jako v případě CMA3 i zde hraje negativní roli variabilita mezi pozorovateli (Li et al., 2019). Třetí metodou, která hodnotí strukturu chromatinu je barvení anilinovou modří. Hraniční hodnota pro tuto metodu byla stanovena na 24 %, společně s citlivostí okolo 82 % a specifikou pak okolo 51 % (Irez et al., 2018). Tato metoda je velmi jednoduchá, na přístroje nenáročná a cenově dostupná. I přesto však není používána v klinické praxi, a to opět kvůli nedostatečné standardizaci. Dle WHO (2021) je problém ve vyhodnocení, které je stejně jako u jiných barvicích metod subjektivní, což snižuje celkovou spolehlivost pro rutinní diagnostiku. Problém s vyhodnocením nastává i v případě aglutinace spermií (WHO, 2021).

I přes snahu o standardizaci a sjednocení postupů daných lékaři je v klinické praxi stále rozpor o zařazení analýzy DNA. V pokynech odborných společností jsou nedostačující doporučení pro zařazení testování SDF (Agarwal et al., 2023). Je tedy potřeba dalšího vylepšení doporučených protokolů pro přesné postupy testování a pokračujícího používání metod pro získání dalších potřebných informací, které by vedly ke zlepšení standardizace protokolů. Testy pro SDF navíc nejsou hrazeny pojišťovnou (Agarwal et al., 2023). V budoucnu by proplacené vyšetření vedlo k častějšímu využití analýzy DNA a tím pádem i k možnému rutinnímu zařazení. Metody pro testování SDF s sebou přináší důležité informace pro následný výběr techniky asistované reprodukce (Esteves et al., 2021), čímž by jejich zařazení mohlo v budoucnu vést k celkovému zlepšení účinnosti a specifičnosti při diagnóze poruch plodnosti.

6 Závěr

V bakalářské práci jsou shrnuty doposud známé mechanismy vzniku fragmentace DNA. Mezi nejčastější mechanismy patří narušení procesu spermiogeneze, oxidativní stres či narušený proces apoptózy. K poškození dochází již během výměny histonů za protaminy, a to ve snaze zmírnit napětí během kondenzace chromatinu. Důležitý je pak i samotný poměr dvou různých protaminů v buňce. Narušení rovnováhy mezi množstvím ROS a antioxidanty vede ke vzniku oxidativního stresu, který způsobuje poškození plazmatické membrány spermií a dochází tak k narušení celkové integrity DNA. Dle literatury se na hromadění poškozených buněk podílí i nefunkční proces naprogramované buněčné smrti. Tyto mechanismy se pak navzájem propojují a společně způsobují celkové poškození spermatické DNA. Vliv mohou mít i genetické či anatomické defekty pohlavních buněk a orgánů. K těm genetickým patří vychýlení počtu chromozomů. Anatomickou vadou je pak varikokéla, jejíž negativní účinky lze zmírnit operací. Ke zvýšené míře fragmentované DNA přispívají i vnější faktory. Patří sem věk, kdy se zvyšujícím se věkem jsou buňky méně schopné opravovat své poškození a dochází tak k jeho navýšení. Negativní dopad může mít i léčba rakoviny v podobě chemoterapie či radioterapie. Životní styl je také důležitým faktorem. Kvalitu spermatických buněk ovlivňuje forma stravování, kouření cigaret či vystavení znečištěnému prostředí.

Hlavní část bakalářské práce byla věnována rešerši zaměřené na metody detekce SDF (fragmentace DNA spermií), které se liší postupem, hraničními hodnotami, způsobem vyhodnocení, ale i typem poškození, které detekují. Pro analýzu DNA bylo do dnešní doby popsáno již několik možných metod. K nejrychlejším testům patří analýza struktury chromatinu (SCSA), která je také řazena mezi ty nejvíce standardizované. Její hlavní nevýhodou je složitost a vysoká cena. Patrně jednodušší a levnější metodou je test disperze chromatinu (SCD). V porovnání se SCSA má SCD vyšší prediktivní sílu, avšak při vyhodnocení může docházet k odchylkám ve výsledcích v závislosti na pozorovateli. TUNEL (terminal deoxynucleotidyl transferase mediated dUTP nick end labeling) a ISNT (in situ nick translation) jsou metody založené na enzymaticky katalyzovaném značení 3'-hydroxylových konců DNA fragmentů. TUNEL je v kombinaci s FC velmi rychlou a spolehlivou metodou, avšak stejně jako v případě SCSA je cena tohoto testu vyšší. Naopak ISNT je levnou a jednoduchou metodou. Nevýhodou může být nižší citlivost této metody. Kometovou analýzu můžeme dělit na alkalickou a neutrální. Dle studií je alkalická kometová analýza považována za nejcitlivější v predikci mužské plodnosti, naopak ta neutrální nevykazuje žádnou prediktivní sílu. Techniky barvení CMA3 (chromomycin A3), toluidinovou či anilinovou modří umožňují hodnocení struktury

chromatinu. Avšak i přes svou praktičnost, jednoduchost či vysokou citlivost nejsou tyto metody příliš využívány. Celkově jsou nejčastěji využívány metody SCSA, TUNEL a SCD, což může být ukazatelem jejich lepší standardizace oproti jiným testům. Největší překážkou v zařazení analýzy DNA do klinické praxe tedy zůstávají nedostatečně standardizované protokoly těchto testů. Celkově je téma rutinního zařazení metod pro detekci SDF stále diskutováno a existují rozporuplné názory napříč odborníky. Na základě této rešerše je možné navrhnout, že plošné zařazení těchto testů do rutinní praxe by v budoucnu opravdu výrazně mohlo přispět k diagnóze poruch plodnosti, testy by mohly být přínosem pro výběr technik asistované reprodukce, a tedy i přínosem pro jejich pozitivní výsledek. Stále je však potřeba dalšího testování metod, především co se týče vylepšení a ucelení jejich protokolů, ale i snaha o rozšíření povědomí o možných testech v neposlední řadě s korektním zpracováním a interpretací dat. Čím více odborníků bude tyto testy používat a doporučovat, tím více bude známo informací pro jejich vylepšení a tím jednodušší bude pak zařazení metod do rutinní klinické praxe.

7 Seznam použité literatury

Hvězdičkou (*) jsou značeny přehledové články

- *Agarwal, A., Barbăroşie, C., Ambar, R., & Finelli, R. (2020). The Impact of Single- and Double-Strand DNA Breaks in Human Spermatozoa on Assisted Reproduction. *International Journal of Molecular Sciences*, 21(11), 1–14. <https://doi.org/10.3390/ijms21113882>
- Agarwal, A., Cho, C.-L., Majzoub, A., & Esteves, S. C. (2017). The Society for Translational Medicine: clinical practice guidelines for sperm DNA fragmentation testing in male infertility. *Translational Andrology and Urology*, 6(S4), S720–S733. <https://doi.org/10.21037/tau.2017.08.06>
- Agarwal, A., Farkouh, A., Saleh, R., Hamoda, T. A. A. M., Salvio, G., Boitrelle, F., Harraz, A. M., Ghayda, R. A., Kavoussi, P., Gül, M., Toprak, T., Russo, G. I., Durairajanayagam, D., Rambhatla, A., Birowo, P., Cannarella, R., Phuoc, N. H. V., Zini, A., Arafa, M., ... Shah, R. (2023). Technical Aspects and Clinical Limitations of Sperm DNA Fragmentation Testing in Male Infertility: A Global Survey, Current Guidelines, and Expert Recommendations. *World Journal of Men's Health*, 41. <https://doi.org/10.5534/wjmh.230076>
- Aoki, V. W., Emery, B. R., Liu, L., & Carrell, D. T. (2006). Protamine levels vary between individual sperm cells of infertile human males and correlate with viability and DNA integrity. *Journal of Andrology*, 27(6), 890–898. <https://doi.org/10.2164/jandrol.106.000703>
- Aparicio, T., Baer, R., & Gautier, J. (2014). DNA double-strand break repair pathway choice and cancer. *DNA Repair*, 19, 169–175. <https://doi.org/10.1016/j.dnarep.2014.03.014>
- Arumugam, M., Shetty, D. P., Kadandale, J. S., & Nalilu, S. K. (2019). Association of Sperm Aneuploidy Frequency and DNA Fragmentation Index in Infertile Men. *Journal of Reproduction & Infertility*, 20(3), 121–126. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/31423414>
- Balhorn, R., Gledhill, B. L., & Wyrobek, A. J. (1977). Mouse sperm chromatin proteins: quantitative isolation and partial characterization. *Biochemistry*, 16(18), 4074–4080. <https://doi.org/10.1021/bi00637a021>
- Bianchi, P. G., Manicardi, G. C., Bizzaro, D., Bianchi, U., & Sakkas, D. (1993). Effect of Deoxyribonucleic Acid Protamination on Fluorochrome Staining and in Situ Nick-Translation of Murine and Human Mature Spermatozoa. *Biology of Reproduction*, 49(5), 1083–1088. <https://doi.org/10.1095/biolreprod49.5.1083>
- Brentnall, M., Rodriguez-Menocal, L., De Guevara, R. L., Cepero, E., & Boise, L. H. (2013). Caspase-9, caspase-3 and caspase-7 have distinct roles during intrinsic apoptosis. *BMC Cell Biology*, 14(1), 32. <https://doi.org/10.1186/1471-2121-14-32>
- Bungum, M., Humaidan, P., Axmon, A., Spano, M., Bungum, L., Erenpreiss, J., & Giwercman, A. (2007). Sperm DNA integrity assessment in prediction of assisted reproduction technology outcome. *Human Reproduction*, 22(1), 174–179. <https://doi.org/10.1093/humrep/del326>
- Carrell, D. T., & Liu, L. (2001). Altered protamine 2 expression is uncommon in donors of known fertility, but common among men with poor fertilizing capacity, and may reflect other abnormalities of spermiogenesis. *Journal of Andrology*, 22(4), 604–610. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11451357>

- Clermont, Y. (1963). The cycle of the seminiferous epithelium in man. *American Journal of Anatomy*, 112(1), 35–51. <https://doi.org/10.1002/aja.1001120103>
- Collins, A. R., Ai-guo, M., & Duthie, S. J. (1995). The kinetics of repair of oxidative DNA damage (strand breaks and oxidised pyrimidines) in human cells. *Mutation Research/DNA Repair*, 336(1), 69–77. [https://doi.org/10.1016/0921-8777\(94\)00043-6](https://doi.org/10.1016/0921-8777(94)00043-6)
- Collins, A. R., Duthie, S. J., & Dobson, V. L. (1993). Direct enzymic detection of endogenous oxidative base damage in human lymphocyte DNA. *Carcinogenesis*, 14(9), 1733–1735. <https://doi.org/10.1093/carcin/14.9.1733>
- Colpi, G. M., Francavilla, S., Haidl, G., Link, K., Behre, H. M., Goulis, D. G., Krausz, C., & Giwercman, A. (2018). European Academy of Andrology guideline Management of oligo-asthenoteratozoospermia. *Andrology*, 6(4), 513–524. <https://doi.org/10.1111/andr.12502>
- Comar, V. A., Petersen, C. G., Mauri, A. L., Mattila, M., Vagnini, L. D., Renzi, A., Petersen, B., Nicoletti, A., Dieamant, F., Oliveira, J. B. A., Baruffi, R. L. R., & Franco Jr, J. G. (2017). Influence of the abstinence period on human sperm quality: analysis of 2,458 semen samples. *JBRA Assisted Reproduction*, 21(4), 306–312. <https://doi.org/10.5935/1518-0557.20170052>
- Darżynkiewicz, Z., Traganos, F., Sharpless, T., & Melamed, M. R. (1975). Thermal denaturation of DNA in situ as studied by acridine orange staining and automated cytofluorometry. *Experimental Cell Research*, 90(2), 411–428. [https://doi.org/10.1016/0014-4827\(75\)90331-6](https://doi.org/10.1016/0014-4827(75)90331-6)
- De Lamirande, E., & Cagnon, C. (1993). Human sperm hyperactivation and capacitation as parts of an oxidative process☆. *Free Radical Biology and Medicine*, 14(2), 157–166. [https://doi.org/10.1016/0891-5849\(93\)90006-G](https://doi.org/10.1016/0891-5849(93)90006-G)
- de Yebra, L., Ballecà, J. L., Vanrell, J. A., Bassas, L., & Oliva, R. (1993). Complete selective absence of protamine P2 in humans. *Journal of Biological Chemistry*, 268(14), 10553–10557. [https://doi.org/10.1016/S0021-9258\(18\)82234-7](https://doi.org/10.1016/S0021-9258(18)82234-7)
- Di Naso, F. C., Simões Dias, A., Porawski, M., & Marroni, N. A. P. (2011). Exogenous Superoxide Dismutase: Action on Liver Oxidative Stress in Animals with Streptozotocin-Induced Diabetes. *Experimental Diabetes Research*, 2011, 1–6. <https://doi.org/10.1155/2011/754132>
- Enciso, M., Sarasa, J., Agarwal, A., Fernández, J. L., & Gosálvez, J. (2009). A two-tailed Comet assay for assessing DNA damage in spermatozoa. *Reproductive BioMedicine Online*, 18(5), 609–616. [https://doi.org/10.1016/S1472-6483\(10\)60003-X](https://doi.org/10.1016/S1472-6483(10)60003-X)
- Erenpreiss, J., Bars, J., Lipatnikova, V., Erenpreisa, J., & Zalkalns, J. (2001). Comparative Study of Cytochemical Tests for Sperm Chromatin Integrity. *Journal of Andrology*, 22(1), 45–53. <https://doi.org/10.1002/j.1939-4640.2001.tb02152.x>
- Esteves, S. C., López-Fernández, C., Martínez, M. G., Silva, E. A., & Gosálvez, J. (2022). Reliability of the sperm chromatin dispersion assay to evaluate sperm deoxyribonucleic acid damage in men with infertility. *Fertility and Sterility*, 117(1), 64–73. <https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2021.08.045>
- Esteves, S. C., Zini, A., Coward, R. M., Evenson, D. P., Gosálvez, J., Lewis, S. E. M., Sharma, R., & Humaidan, P. (2021). Sperm DNA fragmentation testing: Summary evidence and clinical practice recommendations. *Andrologia*, 53(2), e13874. <https://doi.org/10.1111/and.13874>

- Etebari, M., Jafarian-Dehkordi, A., Kahookar, A., & Moradi, S. (2014). Assessment of the deoxyribonucleic acid damage caused by occupational exposure to chemical compounds in Isfahan Polyacryl Company. *Journal of Research in Medical Sciences: The Official Journal of Isfahan University of Medical Sciences*, 19(6), 542–548. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25197297>
- Evenson, D. P. (2013). Sperm Chromatin Structure Assay (SCSA®). In *Sperm Chromatin* (pp. 147–164). Springer New York. https://doi.org/10.1007/978-1-62703-038-0_14
- Evenson, D. P. (2016). The Sperm Chromatin Structure Assay (SCSA®) and other sperm DNA fragmentation tests for evaluation of sperm nuclear DNA integrity as related to fertility. *Animal Reproduction Science*, 169, 56–75. <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2016.01.017>
- Evenson, D. P. (2022). Sperm Chromatin Structure Assay (SCSA®) for Fertility Assessment. *Current Protocols*, 2(8). <https://doi.org/10.1002/cpz1.508>
- Evenson, D. P., Darzynkiewicz, Z., & Melamed, M. R. (1980). Relation of Mammalian Sperm Chromatin Heterogeneity to Fertility. *Science*, 210(4474), 1131–1133. <https://doi.org/10.1126/science.7444440>
- Fernández, J. L., & Gosálvez, J. (2002). Application of FISH to detect DNA damage. DNA breakage detection-FISH (DBD-FISH). *Methods in Molecular Biology (Clifton, N.J.)*, 203, 203–216. <https://doi.org/10.1385/1-59259-179-5:203>
- Fernández, J. L., Muriel, L., Goyanes, V., Segrelles, E., Gosálvez, J., Enciso, M., LaFromboise, M., & De Jonge, C. (2005). Simple determination of human sperm DNA fragmentation with an improved sperm chromatin dispersion test. *Fertility and Sterility*, 84(4), 833–842. <https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2004.11.089>
- Fernández, J. L., Muriel, L., Rivero, M. T., Goyanes, V., Vazquez, R., & Alvarez, J. G. (2003). The Sperm Chromatin Dispersion Test: A Simple Method for the Determination of Sperm DNA Fragmentation. *Journal of Andrology*, 24(1), 59–66. <https://doi.org/10.1002/j.1939-4640.2003.tb02641.x>
- Gandini, L., Sgrò, P., Lombardo, F., Paoli, D., Culasso, F., Toselli, L., Tsamatropoulos, P., & Lenzi, A. (2006). Effect of chemo- or radiotherapy on sperm parameters of testicular cancer patients. *Human Reproduction*, 21(11), 2882–2889. <https://doi.org/10.1093/humrep/del167>
- Gavrieli, Y., Sherman, Y., & Ben-Sasson, S. A. (1992). Identification of programmed cell death in situ via specific labeling of nuclear DNA fragmentation. *The Journal of Cell Biology*, 119(3), 493–501. <https://doi.org/10.1083/jcb.119.3.493>
- Gold, R., Schmied, M., Rothe, G., Zischler, H., Breitschopf, H., Wekerle, H., & Lassmann, H. (1993). Detection of DNA fragmentation in apoptosis: application of in situ nick translation to cell culture systems and tissue sections. *Journal of Histochemistry & Cytochemistry*, 41(7), 1023–1030. <https://doi.org/10.1177/41.7.8515045>
- Hammadeh, M. E., Zeginiadov, T., Rosenbaum, P., Georg, T., Schmidt, W., & Strehler, E. (2001). Predictive value of sperm chromatin condensation (aniline blue staining) in the assessment of male fertility. *Archives of Andrology*, 46(2), 99–104. <https://doi.org/10.1080/01485010117363>
- Heller, C. G., & Clermont, Y. (1963). Spermatogenesis in Man: An Estimate of Its Duration. *Science (New York, N.Y.)*, 140(3563), 184–186. <https://doi.org/10.1126/science.140.3563.184>

- Henkel, R., Hajimohammad, M., Stalf, T., Hoogendijk, C., Mehnert, C., Menkveld, R., Gips, H., Schill, W. B., & Kruger, T. F. (2004). Influence of deoxyribonucleic acid damage on fertilization and pregnancy. *Fertility and Sterility*, *81*(4), 965–972. <https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2003.09.044>
- Henkel, R., Kierspel, E., Stalf, T., Mehnert, C., Menkveld, R., Tinneberg, H. R., Schill, W. B., & Kruger, T. F. (2005). Effect of reactive oxygen species produced by spermatozoa and leukocytes on sperm functions in non-leukocytospermic patients. *Fertility and Sterility*, *83*(3), 635–642. <https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2004.11.022>
- Houston, B. J., Nixon, B., Martin, J. H., De Iuliis, G. N., Trigg, N. A., Bromfield, E. G., McEwan, K. E., & Aitken, R. J. (2018). Heat exposure induces oxidative stress and DNA damage in the male germ line. *Biology of Reproduction*, *98*(4), 593–606. <https://doi.org/10.1093/biolre/iy009>
- Irez, T., Dayioglu, N., Alagöz, M., Karatas, S., & Güralp, O. (2018). The use of aniline blue chromatin condensation test on prediction of pregnancy in mild male factor and unexplained male infertility. *Andrologia*, *50*(10), e13111. <https://doi.org/10.1111/and.13111>
- Iseki, S., & Mori, T. (1985). Histochemical detection of DNA strand scissions in mammalian cells by nick translation. *Cell Biology International Reports*, *9*(5), 471–477. [https://doi.org/10.1016/0309-1651\(85\)90155-9](https://doi.org/10.1016/0309-1651(85)90155-9)
- Itoh, N., Yonehara, S., Ishii, A., Yonehara, M., Mizushima, S. I., Sameshima, M., Hase, A., Seto, Y., & Nagata, S. (1991). The polypeptide encoded by the cDNA for human cell surface antigen Fas can mediate apoptosis. *Cell*, *66*(2), 233–243. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(91\)90614-5](https://doi.org/10.1016/0092-8674(91)90614-5)
- Javed, A., Talkad, M. S., & Ramaiah, M. K. (2019). Evaluation of sperm DNA fragmentation using multiple methods: a comparison of their predictive power for male infertility. *Clinical and Experimental Reproductive Medicine*, *46*(1), 14–21. <https://doi.org/10.5653/cerm.2019.46.1.14>
- Jerre, E., Bungum, M., Evenson, D., & Giwercman, A. (2019). Sperm chromatin structure assay high DNA stainability sperm as a marker of early miscarriage after intracytoplasmic sperm injection. *Fertility and Sterility*, *112*(1), 46-53.e2. <https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2019.03.013>
- Jin, L., Yan, S., Shi, B., Bao, H., Gong, J., Guo, X., & Li, J. (2014). Effects of vitamin A on the milk performance, antioxidant functions and immune functions of dairy cows. *Animal Feed Science and Technology*, *192*, 15–23. <https://doi.org/10.1016/j.anifeedsci.2014.03.003>
- Jones, R., Mann, T., & Sherins, R. (1979). Peroxidative Breakdown of Phospholipids in Human Spermatozoa, Spermicidal Properties of Fatty Acid Peroxides, and Protective Action of Seminal Plasma. *Fertility and Sterility*, *31*(5), 531–537. [https://doi.org/10.1016/S0015-0282\(16\)43999-3](https://doi.org/10.1016/S0015-0282(16)43999-3)
- Jurewicz, J., Radwan, M., Sobala, W., Radwan, P., Bochenek, M., & Hanke, W. (2018). Dietary Patterns and Their Relationship With Semen Quality. *American Journal of Men's Health*, *12*(3), 575–583. <https://doi.org/10.1177/1557988315627139>
- Kawashima, A., Sekizawa, A., Koide, K., Hasegawa, J., Satoh, K., Arakaki, T., Takenaka, S., & Matsuoka, R. (2015). Vitamin C Induces the Reduction of Oxidative Stress and Paradoxically Stimulates the Apoptotic Gene Expression in Extravillous Trophoblasts Derived From First-Trimester Tissue. *Reproductive Sciences*, *22*(7), 783–790. <https://doi.org/10.1177/1933719114561561>

- Kazerooni, T., Asadi, N., Jadid, L., Kazerooni, M., Ghanadi, A., Ghaffarpassand, F., Kazerooni, Y., & Zolghadr, J. (2009). Evaluation of sperm's chromatin quality with acridine orange test, chromomycin A3 and aniline blue staining in couples with unexplained recurrent abortion. *Journal of Assisted Reproduction and Genetics*, 26(11–12), 591–596. <https://doi.org/10.1007/s10815-009-9361-3>
- *Kerr, J. F. R., Wyllie, A. H., & Currie, A. R. (1972). Apoptosis: A Basic Biological Phenomenon with Wideranging Implications in Tissue Kinetics. *British Journal of Cancer*, 26(4), 239–257. <https://doi.org/10.1038/bjc.1972.33>
- Khorramabadi, K. M., Talebi, A. R., Sarcheshmeh, A. A., & Mirjalili, A. (2019). Protective effect of vitamin E on oxidative stress and sperm apoptosis in diabetic Mice. *International Journal of Reproductive BioMedicine*, 17(2), 127. <https://doi.org/10.18502/ijrm.v17i2.3990>
- Kopjar, N., Milas, I., Garaj-Vrhovac, V., & Gamulin, M. (2006). Alkaline comet assay study with breast cancer patients: evaluation of baseline and chemotherapy-induced DNA damage in non-target cells. *Clinical and Experimental Medicine*, 6(4), 177–190. <https://doi.org/10.1007/s10238-006-0113-8>
- Laberge, R. M., & Boissonneault, G. (2005). On the Nature and Origin of DNA Strand Breaks in Elongating Spermatids1. *Biology of Reproduction*, 73(2), 289–296. <https://doi.org/10.1095/biolreprod.104.036939>
- Li, Y. N., Lu, R., Zhang, J., & Zhou, G. (2019). Inter-and intra-observer agreement on the judgment of toluidine blue staining for screening of oral potentially malignant disorders and oral cancer. *Clinical Oral Investigations*, 23(4), 1709–1714. <https://doi.org/10.1007/s00784-018-2595-7>
- Lima, M. I., Arruda, V. O., Alves, E. V., de Azevedo, A. P., Monteiro, S. G., & Pereira, S. R. F. (2010). Genotoxic effects of the antileishmanial drug glucantime. *Archives of Toxicology*, 84(3), 227–232. <https://doi.org/10.1007/s00204-009-0485-0>
- Majzoub, A., Agarwal, A., Cho, C. L., & Esteves, S. C. (2017). Sperm DNA fragmentation testing: A cross sectional survey on current practices of fertility specialists. *Translational Andrology and Urology*, 6, S710–S719. <https://doi.org/10.21037/tau.2017.06.21>
- Meyer-Ficca, M. L., Lonchar, J., Credidio, C., Ihara, M., Li, Y., Wang, Z.-Q., & Meyer, R. G. (2009). Disruption of Poly (ADP-Ribose) Homeostasis Affects Spermiogenesis and Sperm Chromatin Integrity in Mice1. *Biology of Reproduction*, 81(1), 46–55. <https://doi.org/10.1095/biolreprod.108.075390>
- Moskovtsev, S. I., Willis, J., White, J., & Mullen, J. B. M. (2009). Sperm DNA Damage: Correlation to Severity of Semen Abnormalities. *Urology*, 74(4), 789–793. <https://doi.org/10.1016/j.urology.2009.05.043>
- Mostafa, R. M., Nasrallah, Y. S., Hassan, M. M., Farrag, A. F., Majzoub, A., & Agarwal, A. (2018). The effect of cigarette smoking on human seminal parameters, sperm chromatin structure and condensation. *Andrologia*, 50(3). <https://doi.org/10.1111/and.12910>
- Muratori, M., Tamburrino, L., Tocci, V., Costantino, A., Marchiani, S., Giachini, C., Laface, I., Krausz, C., Meriggiola, M. C., Forti, G., & Baldi, E. (2010). Small Variations in Crucial Steps of TUNEL Assay Coupled to Flow Cytometry Greatly Affect Measures of Sperm DNA Fragmentation. *Journal of Andrology*, 31(4), 336–345. <https://doi.org/10.2164/jandrol.109.008508>

- Muriel, L., Goyanes, V., Segrelles, E., Gosálvez, J., Alvarez, J. G., & Fernández, J. L. (2007). Increased Aneuploidy Rate in Sperm With Fragmented DNA as Determined by the Sperm Chromatin Dispersion (SCD) Test and FISH Analysis. *Journal of Andrology*, 28(1), 38–49. <https://doi.org/10.2164/jandrol.106.000067>
- Olive, P. L., Durand, R. E., Banath, J. P., & Johnston, P. J. (2001). Analysis of DNA damage in individual cells. *Methods in cell biology*, 64, 235–249. [https://doi.org/10.1016/S0091-679X\(01\)64016-0](https://doi.org/10.1016/S0091-679X(01)64016-0)
- Ostling, O., & Johanson, K. J. (1984). Microelectrophoretic study of radiation-induced DNA damages in individual mammalian cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 123(1), 291–298. [https://doi.org/10.1016/0006-291X\(84\)90411-X](https://doi.org/10.1016/0006-291X(84)90411-X)
- Paoli, D., Gallo, M., Rizzo, F., Spanò, M., Leter, G., Lombardo, F., Lenzi, A., & Gandini, L. (2015). Testicular cancer and sperm DNA damage: short- and long-term effects of antineoplastic treatment. *Andrology*, 3(1), 122–128. <https://doi.org/10.1111/j.2047-2927.2014.00250.x>
- * Plant, T. M., Zeleznik, A. J., & Albertini, D. F. (2015). *Knobil and Neill's Physiology of Reproduction*. Academic Press. <https://doi.org/10.1016/C2011-1-07288-0>
- Ribas-Maynou, J., García-Peiró, A., Fernández-Encinas, A., Abad, C., Amengual, M. J., Prada, E., Navarro, J., & Benet, J. (2013). Comprehensive analysis of sperm DNA fragmentation by five different assays: TUNEL assay, SCSA, SCD test and alkaline and neutral Comet assay. *Andrology*, 1(5), 715–722. <https://doi.org/10.1111/j.2047-2927.2013.00111.x>
- Ribeiro, S. C., Muratori, M., De Geyter, M., & De Geyter, C. (2017). TUNEL labeling with BrdUTP/anti-BrdUTP greatly underestimates the level of sperm DNA fragmentation in semen evaluation. *PLOS ONE*, 12(8), e0181802. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0181802>
- Robbins, D. J., & Coleman, M. S. (1988). Initiator role of double stranded DNA in terminal transferase catalyzed polymerization reactions. *Nucleic Acids Research*, 16(7), 2943–2957. <https://doi.org/10.1093/nar/16.7.2943>
- Rodriguez, I., Ody, C., Araki, K., Garcia, I., & Vassalli, P. (1997). An early and massive wave of germinal cell apoptosis is required for the development of functional spermatogenesis. *The EMBO Journal*, 16(9), 2262–2270. <https://doi.org/10.1093/emboj/16.9.2262>
- Santi, D., Spaggiari, G., & Simoni, M. (2018). Sperm DNA fragmentation index as a promising predictive tool for male infertility diagnosis and treatment management – meta-analyses. *Reproductive BioMedicine Online*, 37(3), 315–326. <https://doi.org/10.1016/j.rbmo.2018.06.023>
- Sasikumar, S., & Dakshayani, D. (2013). Assessment of sperm DNA integrity by Toluidine blue staining technique in infertile patients and its relation to cryopreservation. In *International Journal of Current Microbiol and Applied Sciences* (Vol. 2, Issue 6). <https://doi.org/10.20546/ijcmas>
- Schlegel, P. N., Sigman, M., Collura, B., De Jonge, C. J., Eisenberg, M. L., Lamb, D. J., Mulhall, J. P., Niederberger, C., Sandlow, J. I., Sokol, R. Z., Spandorfer, S. D., Tanrikut, C., Treadwell, J. R., Oristaglio, J. T., & Zini, A. (2021). Diagnosis and Treatment of Infertility in Men: AUA/ASRM Guideline Part I. *The Journal of Urology*, 205(1), 36–43. <https://doi.org/10.1097/JU.0000000000001521>
- Selevan, S. G., Borkovec, L., Slott, V. L., Zudová, Z., Rubes, J., Evenson, D. P., & Perreault, S. D. (2000). Semen quality and reproductive health of young Czech men exposed to seasonal air pollution. *Environmental Health Perspectives*, 108(9), 887–894. <https://doi.org/10.1289/ehp.00108887>

- Sharma, R., Ahmad, G., Esteves, S. C., & Agarwal, A. (2016). Terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP nick end labeling (TUNEL) assay using bench top flow cytometer for evaluation of sperm DNA fragmentation in fertility laboratories: protocol, reference values, and quality control. *Journal of Assisted Reproduction and Genetics*, 33(2), 291–300. <https://doi.org/10.1007/s10815-015-0635-7>
- Sharma, R. K., Sabanegh, E., Mahfouz, R., Gupta, S., Thiyagarajan, A., & Agarwal, A. (2010). TUNEL as a test for sperm DNA damage in the evaluation of male infertility. *Urology*, 76(6), 1380–1386. <https://doi.org/10.1016/j.urology.2010.04.036>
- Sharma, R., Masaki, J., & Agarwal, A. (2013). Sperm DNA Fragmentation Analysis Using the TUNEL Assay. *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)*, 927, 121-136. https://doi.org/10.1007/978-1-62703-038-0_12
- *Sies, H. (1985). Oxidative Stress: Introductory Remarks. *Oxidative Stress*, 1–8. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-642760-8.50005-3>
- Simon, L., & Carrell, D. T. (2013). Sperm DNA Damage Measured by Comet Assay. *Methods in molecular biology (Clifton N.J.)*, 927, 137-146. https://doi.org/10.1007/978-1-62703-038-0_13
- Simon, L., Castillo, J., Oliva, R., & Lewis, S. E. M. (2011). Relationships between human sperm protamines, DNA damage and assisted reproduction outcomes. *Reproductive BioMedicine Online*, 23(6), 724–734. <https://doi.org/10.1016/j.rbmo.2011.08.010>
- Singh, N. P., McCoy, M. T., Tice, R. R., & Schneider, E. L. (1988). A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. *Experimental Cell Research*, 175(1), 184–191. [https://doi.org/10.1016/0014-4827\(88\)90265-0](https://doi.org/10.1016/0014-4827(88)90265-0)
- Singh, N. P., Muller, C. H., & Berger, R. E. (2003). Effects of age on DNA double-strand breaks and apoptosis in human sperm. *Fertility and Sterility*, 80(6), 1420–1430. <https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2003.04.002>
- Slaughter, M. R., & O'Brien, P. J. (2000). Fully-automated spectrophotometric method for measurement of antioxidant activity of catalase. *Clinical Biochemistry*, 33(7), 525–534. [https://doi.org/10.1016/S0009-9120\(00\)00158-2](https://doi.org/10.1016/S0009-9120(00)00158-2)
- Smith, R., Kaune, H., Parodi, D., Madariaga, M., Rios, R., Morales, I., & Castro, A. (2006). Increased sperm DNA damage in patients with varicocele: Relationship with seminal oxidative stress. *Human Reproduction*, 21(4), 986–993. <https://doi.org/10.1093/humrep/dei429>
- Speit, G., & Rothfuss, A. (2012). The Comet Assay: A Sensitive Genotoxicity Test for the Detection of DNA Damage and Repair. *Methods in Molecular Biology*, vol. 920, 79–90. https://doi.org/10.1007/978-1-61779-998-3_6
- Spermon, J. R., Ramos, L., Wetzels, A. M. M., Sweep, C. G. J., Braat, D. D. M., Kiemeny, L. A. L. M., & Witjes, J. A. (2006). Sperm integrity pre- and post-chemotherapy in men with testicular germ cell cancer. *Human Reproduction*, 21(7), 1781–1786. <https://doi.org/10.1093/humrep/del084>
- Sumner, A. T., Taggart, M. H., Mezzanotte, R., & Ferrucci, L. (1990). Patterns of digestion of human chromosomes by restriction endonucleases demonstrated by in situ nick translation. *The Histochemical Journal*, 22(12), 639–652. <https://doi.org/10.1007/BF01047448>

- Tavilani, H., Doosti, M., Abdi, K., Vaisiraygani, A., & Joshaghani, H. R. (2006). Decreased polyunsaturated and increased saturated fatty acid concentration in spermatozoa from asthenozoospermic males as compared with normozoospermic males. *Andrologia*, *38*(5), 173–178. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0272.2006.00735.x>
- Telli, O., Sarici, H., Kabar, M., Ozgur, B., Resorlu, B., & Bozkurt, S. (2015). Does varicocelectomy affect DNA fragmentation in infertile patients? *Indian Journal of Urology*, *31*(2), 116. <https://doi.org/10.4103/0970-1591.152811>
- Tsarev, I., Bungum, M., Giwercman, A., Erenpreisa, J., Ebessen, T., Ernst, E., & Erenpreiss, J. (2009). Evaluation of male fertility potential by Toluidine Blue test for sperm chromatin structure assessment. *Human Reproduction*, *24*(7), 1569–1574. <https://doi.org/10.1093/humrep/dep068>
- Tsuru-Aoyagi, K., Potts, M. B., Trivedi, A., Pfankuch, T., Raber, J., Wendland, M., Claus, C. P., Koh, S., Ferriero, D., & Noble-Haeusslein, L. J. (2009). Glutathione peroxidase activity modulates recovery in the injured immature brain. *Annals of Neurology*, *65*(5), 540–549. <https://doi.org/10.1002/ana.21600>
- Twigg, J. P., Irvine, D. S., & Aitken, R. J. (1998). Oxidative damage to DNA in human spermatozoa does not preclude pronucleus formation at intracytoplasmic sperm injection. *Human Reproduction*, *13*(7), 1864–1871. <https://doi.org/10.1093/humrep/13.7.1864>
- Vaughan, D. A., Tirado, E., Garcia, D., Datta, V., & Sakkas, D. (2020). DNA fragmentation of sperm: A radical examination of the contribution of oxidative stress and age in 16 945 semen samples. *Human Reproduction*, *35*(10), 2188–2196. <https://doi.org/10.1093/humrep/deaa159>
- Vidya Laxme, B., Stephen, S., Devaraj, R., Mahendran, T., Mithraprabhu, S., & Bertolla, R. P. (2020). Sperm chromatin structure assay versus sperm chromatin dispersion kits: Technical repeatability and choice of assisted reproductive technology procedure. *Clinical and Experimental Reproductive Medicine*, *47*(4), 277–283. <https://doi.org/10.5653/cerm.2020.03860>
- World Health Organization (2021). WHO laboratory manual for the examination and processing of human semen, sixth edition. Geneva: WHO Press.
- Xie, D., Lu, C., Zhu, Y., Zhu, S., Yang, E.-J., & Jin, X. (2018). Analysis on the association between sperm DNA fragmentation index and conventional semen parameters, blood microelements and seminal plasma ROS in male patients with infertility. *Experimental and Therapeutic Medicine*, *15*(6), 5173–5176. <https://doi.org/10.3892/etm.2018.6115>
- Zandemami, M., Qujeq, D., Akhondi, M. M., Kamali, K., Raygani, M., Lakpour, N., Shiraz, E. S., & Sadeghi, M. R. (2012). Correlation of CMA3 Staining with Sperm Quality and Protamine Deficiency. *Laboratory Medicine*, *43*(6), 262–267. <https://doi.org/10.1309/LMB42F9QXYKFLJNG>
- Zheng, W.-W., Song, G., Wang, Q.-L., Liu, S.-W., Zhu, X.-L., Deng, S.-M., Zhong, A., Tan, Y.-M., & Tan, Y. (2018). Sperm DNA damage has a negative effect on early embryonic development following in vitro fertilization. *Asian Journal of Andrology*, *20*(1), 75–79. https://doi.org/10.4103/aja.aja_19_17