

**Univerzita Karlova v Praze  
Farmaceutická fakulta v Hradci Králové  
katedra biologických a lékařských věd**

**Studium fragmentace DNA spermií u  
neplodných mužů**

**Bakalářská práce**

**Vedoucí bakalářské práce: Doc. RNDr. Vladimír Semecký, CSc.**

**HRADEC KRÁLOVÉ, 2015**

**Pavla Popelková**

## **Poděkování**

Na tomto místě bych ráda poděkovala svému školiteli Doc. RNDr. Vladimíru Semeckému, CSc., za odborné vedení.

Dále bych chtěla poděkovat MUDr. Davidovi Rumpíkovi za svolení prezentovat výsledky centra asistované reprodukce IVF Zlín a celému kolektivu laboratoře.

„Prohlašuji, že tato práce je mým původním autorským dílem. Veškerá literatura a další zdroje, z nichž jsem při zpracování čerpala, jsou uvedeny v seznamu použité literatury a v práci jsou řádně citovány. Práce nebyla použita k získání jiného nebo stejného titulu.“

V Hradci Králové 24.2.2015

## Abstrakt

Bakalářská práce se zabývá publikovanými údaji o fragmentaci DNA lidských spermií, popisuje možné příčiny jejich vzniku.

Dále je uveden přehled metod vyšetření integrity DNA spermií.

Praktická část popisuje zavedení metody Halosperm - kit pro stanovení úrovně fragmentace DNA ve spermatozoích.

Touto metodou jsme vyšetřili 61 mužů s diagnózou idiopatické neplodnosti.

U 30% pacientů jsme tímto testem potvrdili silné poškození integrity DNA spermií.

Pregnancy rate (PR) u párů v léčbě AR s diagnózou idiopatická neplodnost jsme posuzovali ve skupině s vysokým indexem fragmentace DNA, kde jsme zaznamenali PR 33%. Ve skupině s neporušenou integritou DNA, kde zůstávají nadále nezjištěné příčiny snížené fertilizační schopnosti spermií byla PR 19%. Rozdíl PR v obou skupinách není statisticky významný.

K oplodnění *in vitro* byla doporučena metoda PICSI.

Základním předpokladem pro úspěšnou reprodukci je nepoškozená integrita DNA spermií. Integrita DNA je relativně nezávislý parametr hodnocení kvality spermií a poskytuje doplňující a diagnostické informace odlišné od konvenční analýzy. V posledních dvou desetiletích probíhají rozsáhlé studie zaměřené na pochopení mechanismů opravy poškozené DNA. Jako důležité se ukazuje vyvinout nové testy orientované na nedestruktivní stanovení reprodukčního potenciálu spermií, které by umožnily použít stejnou zárodečnou buňku pro fertilizaci. Pokrok v této oblasti by zajistil bezpečnou a efektivní diagnostiku v případě rozhodnutí pro asistovanou reprodukci.

### **Klíčová slova:**

Asistovaná reprodukce, fragmentace DNA spermií, Halosperm test

## **Abstract**

The Bachelor thesis addresses published data about fragmentation of human sperm DNA. Overview of examination methods of sperm DNA integrity is also included.

The practical part describes the implementation of method Halosperm – kit for the determination of the DNA fragmentation level in spermatozoa.

61 men with diagnosed idiopathic infertility were examined using this method.

30 % of patients who underwent the test were confirmed to have strong sperm DNA integrity damage. Pregnancy rate (PR) of couples in AR treatment with idiopathic infertility diagnosis was assessed in group with high DNA fragmentation index, where PR of 33 % was registered. In a group with intact DNA integrity, where causes of lowered fertilization ability remain undiscovered, PR equalled 19 %. The difference of PR in both groups is not statistically significant.

For *in vitro* fertilization was recommended PCSI method.

The basic prerequisite for successful reproduction is undamaged integrity of sperm DNA. The DNA integrity is relatively independent parameter of sperm quality evaluation and provides supplementary and diagnostic information, different from conventional semen analysis. Extensive studies focused on understanding mechanisms of repair damaged DNA have taken place for the past two decades. Development of new tests oriented on non-destructive assessment of sperm reproductive potential (which would allow usage of the same germ cell for fertilization) shows significant importance. Progress in this area would ensure safe and effective diagnostics in case of a decision for assisted reproduction.

### **Keywords:**

Assisted reproduction, sperm DNA fragmentation, Halosperm test

# Obsah

Zkratky.....	1
1. Úvod.....	2
1.1 Cíl a zadání bakalářské práce .....	2
2. Teoretická část .....	3
2.1 Struktura chromatinu lidských spermií.....	3
2.2 Etiologie fragmentace DNA.....	4
2.2.1 Vnitřní příčiny.....	4
2.2.2 Vnější příčiny .....	6
2.3 Metody vyšetření spermatu.....	11
2.3.1 Standardní vyšetření .....	11
2.3.2 Přehled metod na vyšetření integrity DNA .....	12
2.4 Test Halosperm .....	14
2.4.1 Charakteristika setu Halosperm.....	14
2.4.2 Princip .....	16
3. Praktická část .....	18
3.1 Metodika a materiál.....	18
3.1.1 Výběr pacientů .....	18
3.1.2 Set Halosperm (SCD) .....	18
3.1.3 Pomůcky a přístroje .....	20
3.1.4 Roztoky pro vizualizaci .....	20
3.2 Pracovní postup .....	21
3.2.1 SCD protokol .....	21
3.2.2 Vizualizace.....	22
3.2.3 Klasifikace spermií.....	22
3.2.4 Pozitivní a negativní kontroly.....	23
3.2.5 Vyhodnocení .....	23
4. Výsledky .....	25
4.1 Stanovení indexu fragmentace DNA.....	25

4.1.1 Soubor .....	25
4.1.2 Věkové skupiny .....	25
4.1.3 Standardní parametry .....	25
4.1.4 Četnost těhotenství.....	26
4.2 Tabulky a grafy .....	26
5. Diskuze .....	29
5.1 Prediktivní hodnota testů .....	29
5.2 Nové techniky výběru spermií.....	30
5.3 Závěry a budoucí směry .....	30
6. Závěr.....	31
7. Seznam obrázků, tabulek a grafů.....	33
8. Literatura a zdroje informací.....	34

## Zkratky

AOT	Acridin Orange Test
AR	Asistovaná reprodukce
ART	Assisted Reproductive Technology
DSBs	Double-strand breaks
ICSI	Intra-cytoplasmic sperm injection
IUI	Intrauterine insemination
IVF	In vitro fertilisation
P1	Protamin typ 1
P2	Protamin typ 2
PICSI	Preselected intracytoplasmic sperm injection
PR	Pregnancy rate
ROS	Reactive oxygen species
SCD	Sperm chromatin disperzion
SCSA	Sperm Chromatin Struktura Assay
SDF	Sperm DNA Fragmentation
SPG	Spermiogram
SSBs	Single-strand breaks
TUNEL	Terminal deoxynucleotidyl transferase mediated dUTP Nick end Labelling
8 - OHdG	8 - hydroxy-2-deoxyguanozin



# 1. Úvod

Neplodnost je v současnosti velmi aktuální téma. Bohužel počet párů s problémem neplodnosti neustále narůstá. Na příčinách se mohou podílet oba partneři. Spermie jsou vysoce specializované buňky s širokým spektrem biologických vlastností. Integrita DNA otcovského genomu je nezbytná pro přenos genetické informace. Poškození chromatinu může vést k mužské infertilitě. Se současným vývojem poznání se zdá být konvenční analýza spermatu (koncentrace, motilita, morfolgie) nedostatečná, proto vzniká potřeba zavedení nových markerů k vyšetření integrity DNA (Zini et al., 2001a, Evenson et al., 2002).

S rozvojem asistované reprodukce je již technicky možné studovat míru poškození DNA spermií. Doposud však nebylo provedeno dostatek studií, které by definovali klinickou hodnotu integrity DNA spermií, avšak potvrzují důležitost nepoškozeného otcovského genomu v početí a udržení těhotenství jak v přirozeném cyklu, tak v asistované reprodukci (Sakkas D., Alvarez JG., 2010).

U těžkých defektů spermií klinická data ukazují na vysokou míru poškození chromatinu mužů (Sun et al., 1997).

## ***1.1 Cíl a zadání bakalářské práce***

Cílem bakalářské práce je studium publikovaných informací zabývajících se fragmentací DNA spermií u neplodných mužů. V práci je uveden přehled příčin vzniku fragmentace DNA a souhrn metod vyšetření integrity DNA.

Cílem praktické části je zhodnocení aplikace nové metody s firemním názvem Halosperm na našem pracovišti asistované reprodukce. K zavedení nové metody nás vedla snaha o zkvalitnění péče o naše pacienty.

## 2. Teoretická část

### 2.1 *Struktura chromatinu lidských spermií*

Tvorba zralých spermií je jedinečný proces zahrnující řadu meiotických a mitotických změn ve struktuře cytoplazmy. Nahrazení histonů jadernými protaminy umožňuje vysoce kompaktní sbalení chromatinu (Pocchia, 1986). DNA spermií je organizovaná specifickým způsobem, který udržuje chromatin v jádře kompaktní a stabilní. Vysoce organizovaná, kompaktní struktura je udržovaná nízkomolekulárními, bazickými nukleoproteiny – protaminy, které jsou nejméně šestkrát více kondenzované než v mitotických chromozomech (Fuentes-Mascorro et al., 2000).

Chromatin spermií se tímto uspořádáním odlišuje od somatických buněk. Během spermiogeneze protaminy nahrazují většinu histonů (Gonzales-Marín et al., 2012). Chromatin je svinutý do unikátní struktury nazvané toroid (Conwell et al., 2003). Poměr zastoupení protaminů a histonů se druhově liší, u lidské spermie je nahrazeno 85% histonů (Gatewood et al., 1990).

Protaminy se váží k DNA svými argininovými zbytky a cysteinové se podílí na tvorbě disulfidických vazeb, které kondenzují strukturu DNA (Godeas et al., 1997). Lidské spermie na rozdíl od zvířecích druhů, u nichž je přítomen pouze jeden typ protaminu (P1) obsahují i druhý typ (P2), který má nedostatek cysteinových zbytků. Z tohoto důvodu má chromatin lidských spermií nižší úroveň volných thiolových skupin potřebných pro tvorbu disulfidických můstků a je tedy potenciaálně méně stabilní (Janger, 1990).

Proces protaminace, vytvoření disulfidických vazeb a remodelace chromatinu jsou tedy esenciální pro stabilizaci nukleární DNA. Chybná nebo neúplná protaminace během spermiogeneze byla v řadě studií označena za hlavní faktor ovlivňující kondenzaci chromatinu lidských spermií (Sakkas et al., 2010).

## **2.2 Etiologie fragmentace DNA**

Fragmentace DNA je charakterizována zlomy jednoho nebo obou vláken DNA, často přítomných v ejakulátu subfertálních mužů (Irvine, 2000). Signifikantně zvýšené poškození DNA spermií lze nalézt i u mužů s normálními standardními parametry ejakulátu (koncentrace, motilita, morfologie). Analýza fragmentace DNA může odhalit skrytou příčinu infertility, klasifikovanou na základě standardních parametrů (vyšetření spermogramu) jako idiopatická neplodnost (Saleh et al., 2002).

Spermie od somatických buněk odlišují dvě pozoruhodné vlastnosti a to protaminace a absence reparačních mechanismů DNA. Opravy DNA spermatu jsou ukončeny po spermiogenezi. Tyto buňky pak nemohou opravit poškození vzniklá při transportu přes epididymis a po ejakulaci.

Fragmentaci DNA spermií mohou vyvolat jak vnitřní, tak vnější faktory (González – Marín at al., 2012).

### **2.2.1 Vnitřní příčiny**

Poškození struktury chromatinu vzniká z následujících potencionálních zdrojů:

#### **2.2.1.1 Nedostatky v rekombinaci během spermatogeneze**

Chyby při rekombinaci obvykle vedou k buněčnému kolapsu. Meiotický crossing - over je spojen s geneticky naprogramovaným rozpadem DNA specifickými nukleázami. Možnosti zesíťování (kovalentní uchycení) DNA – DNA nebo DNA – protein jsou větší ve vysoce kompaktním chromatinu zralých spermií než v somatických buňkách (González – Marín at al., 2012).

Poslední studie katecholových estrogenů prokázaly tvorbu dimerů, které kovalentně zesíťují DNA. Tím se DNA stává zcela rezistentní vůči dekonzenzačním protokolům používaných v comet assay včetně použití redukčních činidel, detergentů a širokému spektru proteáz (Bennetts et al, 2008). Silné zesíťování chromatinu se běžně vyskytuje v populaci defektních spermií (Windt et al., 1994), ale molekulární základ této silné stabilizace je stále neznámý (González – Marín at al., 2012).

### **2.2.1.2 Porucha maturace spermatid**

V DNA spermií se nacházejí segmenty, které umožňují přechodné snížení torzního napětí, uvolnění histonů z jádra nukleozomu a jejich nahrazení protaminy. Tato místa jsou chráněna kompaktním balením chromatinu. Balení chromatinu okolo nových protaminových jader a obnovení integrity DNA by mělo být dokončeno během průchodu nadvarletem (Mengual et al., 2003). Pokud nejsou tyto přechodné zlomy opraveny, může se v ejakulovaných spermiích vyskytovat fragmentovaná DNA (González – Marín et al., 2012).

### **2.2.1.3 Poměr protaminu 1 a 2**

V průběhu spermiogeneze dochází k postupnému nahrazení 85% - 95% histonů protaminy (Oliva, 2006). Jednotlivé kroky zahrnují hyperacetylaci histonů, které jsou nahrazeny specifickými histony varlat, následuje jejich nahrazení přechodnými proteiny a výměna za protaminy P1 a P2. V lidském spermatu jsou P1 a P2 vyjádřeny obvykle v poměru 1:1, poskytují těsné balení DNA spermií, zpevnění jádra a ukončení genové exprese (Carrell et al., 2001). Abnormálně vysoký a nízký poměr P1/P2 je spojen se zvýšenou fragmentací DNA, sníženou plodností, špatnou kvalitou embryí a redukuje úspěšnost těhotenství (Simon et al., 2011, García-Peiró et al., 2011).

### **2.2.1.4 Neúspěšná apoptóza**

Neúspěšná apoptóza může být alternativní příčinou dvouvláknových DNA zlomů (DSBs) u infertilních mužů. Mužské zárodečné buňky při transformaci na vysoce diferencované spermatozoa ztrácejí postupně schopnost programované buněčné smrti a stávají se transkripčně a translačně neaktivní. Místo apoptózy vstupují tyto zárodečné buňky do redukované formy procesu, který vede k fragmentaci DNA v jádře (Sakkas et al., 2004). Proces vedoucí k buněčné smrti poškozených buněk nemusí vždy pracovat efektivně. Určité procento těchto defektních spermií, může během spermiogeneze diferencovat ve zralé funkční spermie a jejich schopnost oplodnění může zůstat zachována (Burrello et al., 2004).

### **2.2.1.5 Oxidativní stres**

Reaktivní formy kyslíku (ROS) v organismech ovlivňují řadu pozitivních fyziologických procesů, jako buněčnou proliferaci a diferenciaci. Koncentrace ROS musí být udržována na hladině, při které nedochází k poškození buněk. Působením těchto vysoce reaktivních částic dochází k narušení různých buněčných struktur, včetně molekul DNA (Aitken et al., 2011,2012).

U fertilních mužů je množství ROS pod kontrolou antioxidantních molekul přítomných v seminální plazmě. Patogenní účinky se projeví při nadbytečné produkci kyslíkových radikálů, ale také v důsledku nedostatečné antioxidantní ochrany. Běžným produktem oxidace DNA je 8-hydroxy-2-deoxyguanozin (8-OHdG), který slouží jako ukazatel míry oxidativního poškození DNA.

Jednovláčkové zlomy (SSB) jsou přímým důsledkem oxidativního útoku na spermiie, zatímco dvouvláčkové zlomy (DSBs) pravděpodobně vznikají expozicí 4-hydroxy-2-nonenalu, klíčového produktu peroxidace lipidů (Badouard et al., 2008). Tvorba 8-OHdG silně koreluje s množstvím zlomů vláken a fragmentací DNA (De Iuliis et al.,2009).

## **2.2.2 Vnější příčiny**

Mezi tyto příčiny můžeme zahrnout některé techniky používané v asistované reprodukci, infekce, ischemie mužských reprodukčních orgánů a další.

### **2.2.2.1 Časový posun od ejakulace**

Fragmentace DNA ve spermatu není statický parametr. Životaschopnost spermií se snižuje postupně v závislosti na časovém odstupu od ejakulace (González – Marín et al, 2012). Některé studie uvádějí významné rozdíly v dynamice fragmentace DNA mezi jednotlivými druhy a jedinci, avšak příčiny těchto změn jsou dosud nejasné. Studie prováděné na kryokonzervovaných spermiích jedenácti druhů savců ukazují, že exprese protaminu P2 zvyšuje pravděpodobnost fragmentace DNA a

naopak přítomnost většího množství cysteinových zbytků protaminu P1 má tendenci stabilizovat strukturu DNA ve spermatu (Gosálvez et al., 2011).

#### **2.2.2.2 Příprava spermií pro asistovanou reprodukci**

Podle literatury techniky používané k oplodnění *in vitro*, jako kapacitace spermií a akrozomální reakce nepoškozují DNA ani nepříznivě neovlivňují složení histonů. Podporují fyziologickou remodelaci nepoškozeného chromatinu DNA spermií a přípravu chromatinu k fertilizaci (De Lamirande et al., 2012). Pro *in vitro* fertilizaci (IVF) byla doporučena kombinace metod hustotního gradientu a swim-up, u kterých byla zjištěna vyšší míra motility spermií a redukce fragmentované DNA (Bormann et al., 2008, Jayaraman et al., 2012).

#### **2.2.2.3 Teplota skladování a kryokonzervace**

Kryokonzervace může významně poškodit strukturu a funkci spermií. Studie srovnávající změny fragmentace DNA před a po kryokonzervaci ukazují na snížení viability DNA. Proto je důležité zvážit použití této techniky například v léčbě neplodných párů (Jackson et al., 2010, Gosálvez et al., 2010).

#### **2.2.2.4 Post - testikulární oxidativní stres**

Nezralé spermie produkují vysoké hladiny ROS. Mohou vyvolat poškození DNA zralých spermií. ROS mohou vyvolat fragmentaci DNA přímo, nebo nepřímo prostřednictvím aktivace kaspáz spermií a endonukleáz. K tomuto defektu může dojít při společném transportu obou typů buněk ze semenotvorných kanálků do nadvarlete a po ejakulaci (Gil-Guzman et al., 2001).

Při centrifugaci, používané k přípravě spermií v asistované reprodukci (AR), mohou nezralé formy spermií (s vysokou hladinou ROS) díky těsnému kontaktu, indukovat fragmentaci DNA zralých spermií. Expozice zralých spermií *in vitro* reaktivním formám kyslíku vede k významnému poškození DNA (Aitkem et al., 1998).

### **2.2.2.5 Varikokéla**

Varikokéla se vyskytuje přibližně u 15% až 20% běžné populace mužů a je častou příčinou nízké produkce spermií a také negativně ovlivňuje kvalitu semene. U pacientů s varikokélou byl prokázán signifikantně vyšší index fragmentace DNA. Výskyt abnormální DNA nezralého chromatinu je statisticky významně vyšší u infertilních pacientů s varikokélou než u neplodných mužů bez varikokély (Talebi et al., 2008, Zini et al., 2011, Peluso et al., 2013).

### **2.2.2.6 Bakteriální infekce**

*Chlamydia trachomatis* a *Mycoplasma* patří mezi časté původce infekcí urogenitálního traktu, které zvyšují fragmentaci DNA spermií. ATB léčba je důležitá k zabránění rozšíření infekce, indukující poškození DNA ( Gallegos et al., 2008).

### **2.2.2.7 Věk**

Studie zabývající se vlivem věku muže na schopnost oplodnění jsou nejednoznačné. Některé nepotvrdily souvislost tohoto parametru s fertilizační schopností spermií (Winkle at al., 2009, Nijs et al., 2011). Naopak v jiných studiích naznačují významné zvýšení fragmentované DNA spermií v souvislost s věkem. Poškození DNA je výrazně nižší u mužů do 35 let ( Vagnini et al., 2007, Belloc et al., 2009).

### **2.2.2.8 Pohlavní abstinence**

Délka abstinence může ovlivnit počet spermií a objem ejakulátu. Abstinence neovlivňuje pH, životaschopnost, morfologii, motilitu spermií ani fragmentaci DNA (De Jonge et al., 2004). Na druhé straně pozdější studie uvádějí nižší index fragmentace (SDF) po kratším období mezi ejakulacemi (24h a 3h) než je doporučováno dle WHO 2010, 3 – 5 dnů (Gosálvez et al., 2011).

### **2.2.2.9 Teplota varlat**

Testikulární funkce je ovlivněna teplotou, která je umístěním varlat ve skrotu o dva stupně nižší než tělesná.

Na myších modelech byl potvrzen vliv působení vyšší teploty na fragmentaci DNA a také na snížení pregnancy rate . (Paul et al., 2008).

### **2.2.2.10 Vliv klinické léčby, léků a toxických látek**

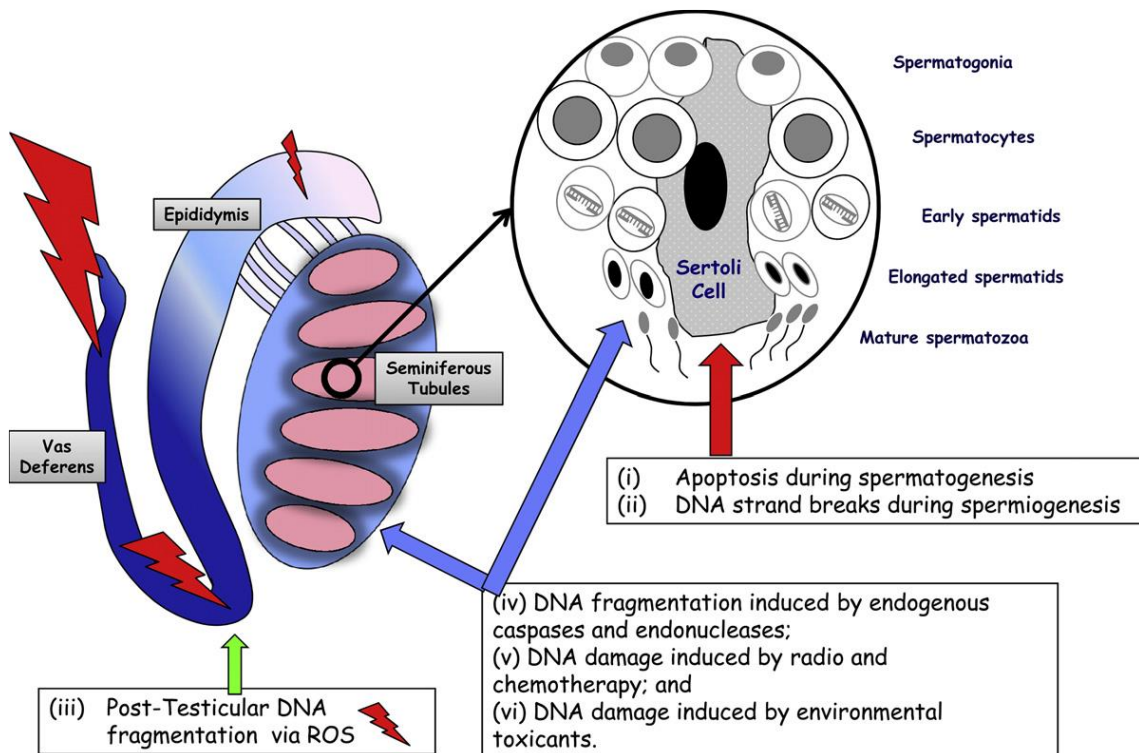
Léčba rakoviny může indukovat poškození DNA spermií. Chemoterapie a radioterapie mají cytotoxický vliv na zárodečný epitel (Gosálvez et al., 2011).

Studie z roku 2010 upozorňuje na nepříznivé působení paroxetinu (antidepresivum) na spermie u významného podílu pacientů (Tanrikut et al., 2010).

Jen u malého procenta chemických látek byl posuzován vliv specificky na spermie. Přesto některé studie poukazují na souvislost mezi vysokou hladinou znečištěného ovzduší a zvýšeným poškozením DNA v lidských spermích (Rubes et al.,2007).



**Obrázek 1: Hlavní příčiny poškození DNA ve spermích**



- (i) apoptóza během spermatogeneze, (ii) zlomy DNA vzniklé v průběhu remodelace, (iii) post – testikulární fragmentace DNA vyvolané reaktivními formami kyslíku při transportu ze semenotvorných kanálků do nadvarlete, (iv) DNA fragmentace vyvolané kaspázami a endonukleázami, (v) poškození DNA radioterapií a chemoterapií, (vi) poškození DNA toxickými látkami

Zdroj: Sakkas. Sperm DNA fragmentation. Fertil Steril 2010

## **2.3 Metody vyšetření spermatu**

Vyšetření spermatozoí zahrnuje standardní metody k posouzení základních parametrů spermií (koncentrace, motilita, morfologie) a také metody speciální, zaměřené na integritu DNA.

### **2.3.1 Standardní vyšetření**

Základním vyšetřením spermií je posouzení spermiogramu.

Na základě mikroskopického pozorování vzorku ejakulátu se určí jeho kvalita podle doporučení manuálu WHO 2010. Jsou hodnoceny následující parametry: vzhled, zkapalnění, viskozita, objem, celkový počet spermií, koncentrace spermií, motilita, morfologie, příp. orientační morfologie, pH.

#### **Doporučení norem dle WHO 2010 (WHO manuál, 2010)**

Objem ejakulátu:	min. 1,5 ml
Koncentrace spermií:	min. 15 mil/ml
Celkový počet spermií:	min. 39 mil
Progresivní pohyb:	min. 32 %
Celková pohyblivost:	min 40 %
Zastoupení morfologicky normálních spermií:	min. 4%
pH:	více než 7,2

### **2.3.2 Přehled metod na vyšetření integrity DNA**

Několik prací z posledních let zaměřených na integritu DNA potvrzuje potřebu testování tohoto parametru (Sun et al., 1997, Spano et al., 2000). Bylo zavedeno několik metod, které jsou dále korigovány podle posledních poznatků.

Četné studie naznačují souvislost mezi poškozením DNA a početím jak přirozeným, tak při IVF (Evenson et al., 1999, 2002., Agarwal et al., 2003).

#### **2.3.2.1 SCSA**

Metoda Sperm Chromatin Structure Assay (SCSA) byla poprvé popsána v roce 1980 v časopise Science (Evenson et al., 1980). Je modifikací Acridin Orange Test (AOT) který využívá vizuálního hodnocení fluorescence spermií v mikroskopu. Oba testy měří citlivost spermatické DNA k denuraci indukované kyselinou in situ.

U metody SCSA se detekce provádí pomocí průtokové cytometrie a umožňuje stanovit velká kvanta spermií ve vzorku. Používá se metachromatická barva akridin oranž, která vykazuje rozdílnou fluorescenci. Navázání barvy na fragmentovanou DNA se projeví červenou fluorescencí, na nepoškozenou DNA zelenou fluorescencí. SCSA udává poměr fragmentované DNA k celkovému počtu spermií, vyjádřený jako index fragmentace DNA (Shamsi et al., 2011).

#### **2.3.2.2 ISNT**

In situ nick translation (ISNT) kvantifikuje začlenění biotinylovaného dUTP na jednovláknové DNA v reakci katalyzované templát dependentním enzymem, DNA polymerázou 1. Měřeným parametrem je počet spermií vykazujících fluorescenci, které reprezentují začleněný dUTP. ISNT je jednoduchý a levný test. K analýze vyžaduje pouze fluorescenční mikroskop. Jeho nevýhodou je použití pouze pro detekci jednovláknových zlomů (Shamsi et al., 2011).

### **2.3.2.3 TUNEL**

Metoda Terminal deoxynucleotidyl transferase mediated dUTP Nick end Labelling (TUNEL) kvantifikuje začlenění biotinylovaného dUTP na dvojité zlomy DNA. Reakce je katalyzovaná templát independentním enzymem, terminální deoxynukleotid transferázou. Tato technika hodnotí podíl značených buněk s poškozenou DNA, který lze měřit ve světelném i fluorescenčním mikroskopu a také s využitím průtokové cytometrie. TUNEL je metoda citlivá jak pro jednovláknové, tak pro dvouvláknové zlomy DNA (Shamsi et al., 2011).

### **2.3.2.4 Comet Assay**

V Comet Assay nazvaném také Single Cell Gell Electrophoresis (SCGE) jsou buňky vloženy do agarózového gelu, poté pomocí lyzačního roztoku očištěny od proteinových zbytků a umístěny v elektrickém poli. Pohyb fragmentované DNA z poškozeného chromatinu spermií se stává viditelný. Buňky s fragmentovanou DNA jsou značeny specifickými barvivy a jeví se jako komety.

Test je variantou elektroforézy na tenké vrstvě, kde menší fragmenty DNA migrují dále než větší fragmenty. Intenzita zbarvení a délka ocasu komety představuje množství migrované DNA, což vyjadřuje různé stupně fragmentace DNA (Singh et al., 1988). Vyhodnocené parametry (intenzita, délka, pohyb ocasu) jsou analyzovány pomocí specializovaného softwaru (Shamsi et al., 2011).

### **2.3.2.5 SCD**

Sperm chromatin disperzion (SCD) je založena na schopnosti nepoškozené DNA (zbavené chromatinových proteinů), tvořit rozptýlenou smyčku okolo jádra spermií, tzv. halo efekt (Shamsi et al., 2011).

## **2.4 Test Halosperm**

Základem testu je disperze chromatinu spermií (SCD). Nepoškozená DNA (zbavená chromatinových proteinů) může tvořit rozptýlenou smyčku okolo jádra spermií, tzv. halo efekt. U spermií s fragmentovanou DNA k tomuto efektu nedochází. Poměr nepoškozených spermií je možné po obarvení hodnotit ve světelném mikroskopu (Shamsi et al., 2011).

### **2.4.1 Charakteristika setu Halosperm**

Integrita DNA spermií je základním předpokladem pro úspěšnou reprodukci, je relativně nezávislým parametrem kvality spermií a poskytuje doplňující a diagnostické informace odlišné od konvenční analýzy (vyšetření spermiogramu). Mnohé studie potvrdili hodnocení fragmentace DNA jako vhodný prognostický marker početí a úspěšného těhotenství (Agarwal et al., 2003, Shamsi et al., 2011).

Existuje více technik pro detekci fragmentace DNA např. TUNEL, ISNT, Comet assay, SCSA (Agarwal et al., 2003, Evenson et al., 2002). Některé však vyžadují nákladné vybavení pro objektivní analýzu, nebo jsou náročné na pracovní sílu. Z těchto důvodů jsou tyto postupy vhodné především pro výzkumné účely a ne pro rutinní diagnostické použití v klinické andrologické laboratoři (Fernández et al., 2005).

Na základě techniky SCD, kterou poprvé popsal Fernández et al., 2003, vyvinula firma Halotech rychlý a jednoduchý diagnostický set Halosperm. Od původní metodiky SCD došlo k zdokonalení protokolu soupravy Halosperm. Nová metodika vede k lepšímu zachování chromatinu a tedy k vysoce kontrastnímu obrazu s viditelným halo efektem, pozorovaném ve světelném mikroskopu. Také jsou zachovány bičíky spermií, takže je možné jednoznačně rozlišit spermie od jiných typů buněk (Fernández et al., 2005).

Halosperm stanovuje poměr spermií s celistvou DNA a fragmentovanou DNA, umožňuje výpočet procenta poškozených buněk tzv. index fragmentace DNA (SDF). Za závažnou poruchu kvality DNA je považována hodnota  $SDF \geq 30\%$  (Evenson et al., 2002).

Při potvrzení vysoké fragmentace DNA spermií u našich pacientů ( $\geq 30\%$ ), doporučujeme zvolit jako techniku umělého oplodnění metodu PICSi, při které lze vybrat zralé spermie. Principem metody je specifická vazba pouze zralých spermií na gel hyaluronanu (PICSi for Sperm Selection. Origio, 2013 [online]).

#### **Použití metody Halosperm:**

- usnadňuje rozhodování o IVF s intracytoplazmatickou injekcí spermie do vajíčka (ICSI)
- posouzení kvality spermatu donorů
- umožňuje nalézt příčinu u nevysvětlitelné neplodnosti trvající více než 6 měsíců až 1 rok
- u opakovaných spontánních potratů
- u mužů nad 40 let
- u mužů s nezdravým životním stylem (kouření, alkohol, nadváha)
- u mužů vystaveným toxickým látkám
- špatná kvalita embrya při druhém donorském cyklu s darovanými vajíčky
- idiopatickým mužským faktorem  
(Halosperm: DNA fragmentation analysis, human diagnostic, Halotech DNA, 2010 [online])

#### **Výhody metody Halosperm:**

- testován speciálně pro lidské spermie
- jednoduchá, rychlá analýza
- ekonomicky výhodná (pouze základní laboratorní vybavení)
- umožňuje hodnocení pomocí světelného mikroskopu
- lze testovat i vzorky s nízkou koncentrací spermií (oligozoospermie)
- vysoce reprodukovatelný test  
(Fernández et al., 2005)

## 2.4.2 Princip

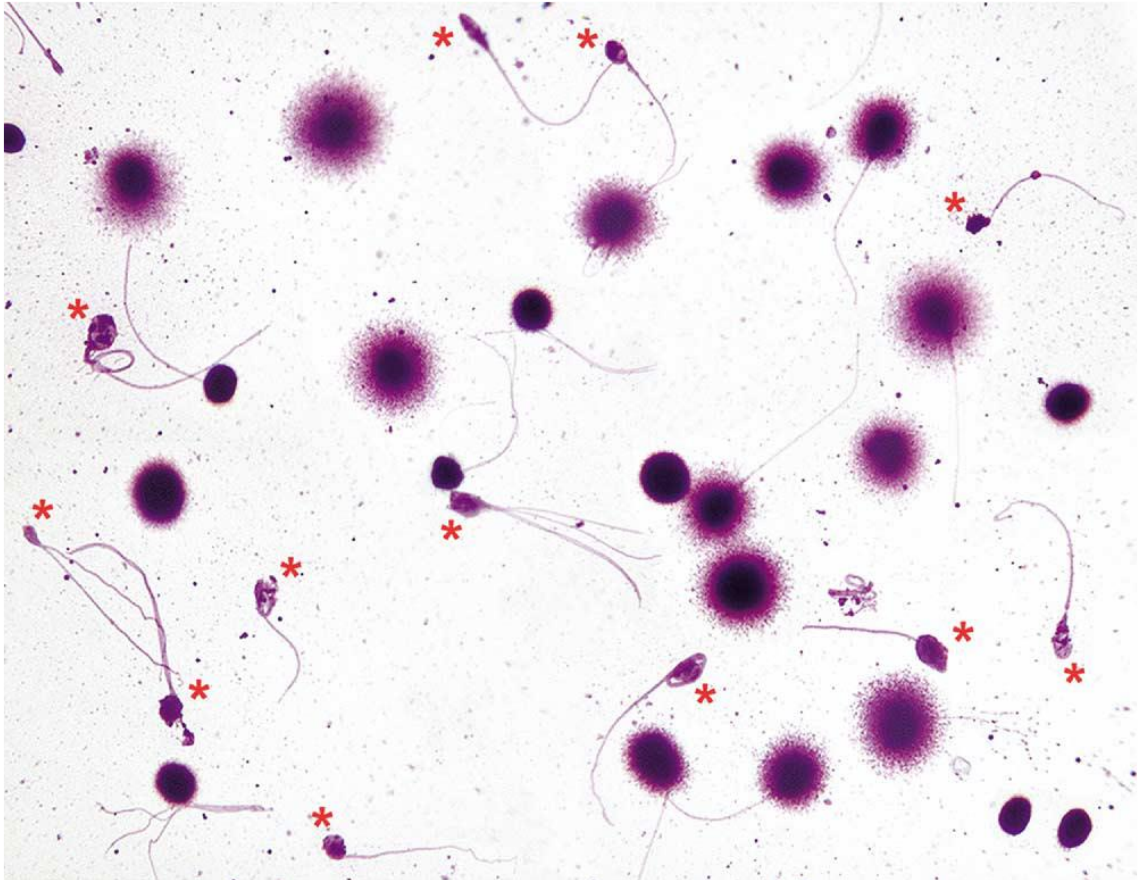
Metoda je založena na testu disperze chromatinu spermií (SCD), (Fernández et al., 2003, 2005, 2011).

Nefixované spermie (ejakulované, kryokonzervované, ředěné) se ponoří do inertního agarosového mikrogelu, naneseném na podložním skle. DNA denaturuje po počátečním ošetření kyselinou, zlomy DNA se transformují na jednovláknové molekuly DNA. Následuje odstranění jaderných protaminů v lyzačním roztoku. Po obarvení vykazují spermie bez fragmentované DNA rozsáhlé rozšíření smyček DNA kolem jádra, halo efekt. Fragmentovaná DNA se zobrazí s malým nebo žádným halo efektem.

Výsledek testu může být vizualizován za použití fluorescenční mikroskopie i se standardním světelným mikroskopem (Fernández et al., 2011).

Výsledky získané za použití techniky SCD byly validovány za použití jiných technik dostupných na trhu jako TUNEL nebo SCSA (Fernández et al., 2005).

**Obrázek 2: Test Halosperm**



Spermie s fragmentovanou DNA – bez halo (hvězdičky)

Spermie s neporušenou integritou DNA – s halo efektem

Zdroj: Fernández. Simple determination of human sperm DNA

fragmentation with an improved sperm chromatin dispersion test. Fertil Steril 2005



## **3. Praktická část**

### **3.1 Metodika a materiál**

Test Halosperm - metodu založenou na disperzi chromatinu spermií (Sperm chromatin disperzion - SCD) jsme se rozhodli zavést na našem pracovišti k zvýšení úspěšnosti léčby neplodnosti. Hledali jsme test, který by nám usnadnil výběr techniky pro oplodnění *in vitro*, byl jednoduchý, rychlý, komerčně dostupný, proveditelný se základním laboratorním vybavením. V literatuře jsme vyhledali patentovanou metodu firmy Halotech DNA – Halosperm (Fernández et al., 2005, About us, Halotech DNA, 2010 [online]), který splňoval naše požadavky.

#### **3.1.1 Výběr pacientů**

Do souboru byli zařazeni pacienti po opakovaném selhání léčby neplodnosti. Celkem bylo vyšetřeno 61 pacientů ve věku 28 – 59 let.

K analýze jsme použili ejakulované spermie. Zpracované mohou být i vzorky kryokonzervované a mražené při teplotě -20°C. Před analýzou musí být tyto vzorky rozmrazeny při pokojové teplotě a ihned zpracovány (Halosperm: User Manual. Halotech DNA [online]).

#### **3.1.2 Set Halosperm (SCD)**

Souprava pro stanovení úrovně fragmentace DNA spermatozoí.

### **3.1.2.1 Výrobce**

HALOTECH DNA SL

PCM Parque Científico de Madrid, C/ Faraday, 7. Planta 1. Oficina 1.08. Campus de Cantoblanco. 28049 Madrid

### **3.1.2.2 Komponenty**

- Agarosa 9012-36-6
- Kyselina chlorovodíková 7614-01-0
- Chlorid sodný 7647-14-5
- Tris 77-86-1
- Dithiothreitol (DTT) 3483-12-3
- Triton X – 100 9002-93-1
- Dvakrát destilovaná voda

### **3.1.2.3 Reagencie**

- SCS potažené podložní skla (Super coated Slides)
- ACS agarosa (Agarose Cell Support)
- DA denaturační roztok (Denaturation acid)
- LS lyzační roztok (Lysis solution)

### 3.1.3 Pomůcky a přístroje

- Mikroskop světelný nebo fluorescenční
- Lednice 4°C
- Vodní lázeň 90-100° C, 37°C
- Krycí skla 18 x 18 mm nebo 22 x 22 mm
- Mikropipety
- Misky pro horizontální inkubaci
- Ethanol 70%, 90%, 100%
- Mikrovlnný ohřev
- Digestoř

### 3.1.4 Roztoky pro vizualizaci

- Světelný mikroskop barvy Diff – Quick
- Fluorescenční fluochromy pro barvení DNA
- Fosfátový pufr pH 6,88 (Merk 1.07294, 1000 ml)
- Montovací médium Eukitt (Panreac 253681)

## **3.2 Pracovní postup**

### **3.2.1 SCD protokol**

1. Alikvótní část spermatu zředit fosfátovým pufrem na koncentraci 5 -10 mil./ml
2. Lyzační roztok (LS) temperovat při pokojové teplotě
3. Eppendorf zkumavky s agarosou (ACS) umístit na plováku po dobu 5 min. do vodní lázně při teplotě 90°C - 100°C (rozpuštění agarosového gelu)
4. Přenést Eppendorf zkumavky i s plovákem do vodní lázně 37°C, ponechat 5 min. do vyrovnání teploty
5. Přidat 25 µl vzorku spermatu do Eppendorf zkumavek s agarosou a promíchat. Přenést 20 µl suspenze s agarosou na ošetřené podložní sklo a překrýt krycím sklem.
6. Dbát na dodržení horizontální polohy při práci se sklíčkem
7. Umístit sklíčko na studené podložce v lednici při teplotě 4°C po dobu 5 min.
8. Naředit denaturační roztok (DA), 80 µl DA do 10 ml destilované vody. Zamíchat a umístit do inkubační misky
9. Odstranit opatrně krycí sklíčko, nadále pracovat s podložním sklem v horizontální poloze pomocí pinzety
10. Ihned ponořit podložní sklo do DA (krok 8). Inkubovat 7 min.
11. Následně přemístit do inkubační misky s LS. Inkubovat 25 min.
12. Po vyjmutí z LS vložit do destilované vody. Inkubovat 5 min.
13. Dehydratace v rostoucí koncentraci alkoholu, v misce s 70% ethanolem (2 min.), 90% ethanolem (2 min), 100% ethanolem (2 min)
14. Sušit při pokojové teplotě, po vysušení barvit viz 3.2.2.
15. Sklíčka mohou být skladována při pokojové teplotě v dobře uzavřené krabici, ve tmě, po dobu několika měsíců

**Upozornění:** sklíčka musí být zpracována v digestoři

### 3.2.2 Vizualizace

#### Pro světelný mikroskop:

- Diff Quik barvicí roztok – inkubovat sklíčko v roztoku eosinu 7 min., následně v roztoku Azur B 7 min, sušit při pokojové teplotě.
- Wright barvicí roztok – naředit s PBS 1:1, vložit do barvicího roztoku, nechat v proudícím vzduchu 10 – 15 min., vyjmout z barvicího roztoku, krátce promýt v tekoucí vodě a nechat uschnout při pokojové teplotě.

#### Pro fluorescenční mikroskop:

- Fluorochromy pro barvení DNA

Silné barvení je výhodné pro více kontrastní obraz disperze chromatinu DNA.

### 3.2.3 Klasifikace spermií

#### Spermie bez fragmentace DNA:

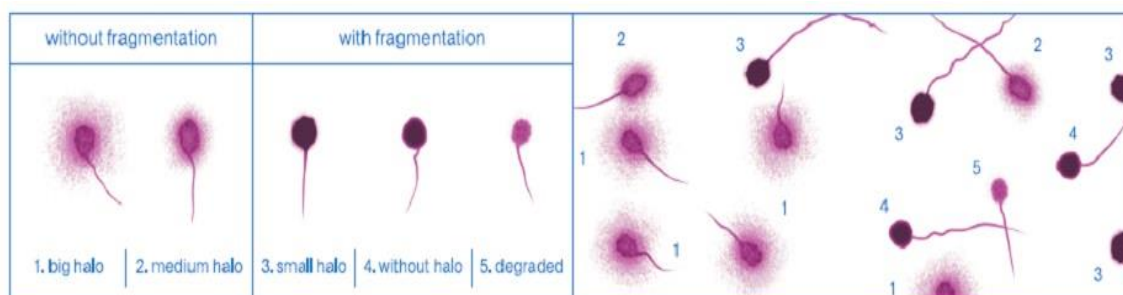
- spermie s velkým halo efektem (1)
- spermie se středním halo efektem (2)

#### Spermie s fragmentovanou DNA:

- spermie s malým halo efektem (3)
- spermie bez halo efektu (4)
- spermie bez halo efektu a degradované (5)

Doporučení: počítat minimálně 500 spermií na vzorek (Fernández et al., 2005)

**Obrázek 3: Halo efekt**



Zdroj: Halosperm: User Manual. Halotech DNA [online]

### **Výpočet indexu fragmentace DNA (SDF):**

$SDF (\%) = 100 \times \frac{\text{počet spermií s fragmentovanou DNA}}{\text{celkový počet hodnocených spermií}}$

### **3.2.4 Pozitivní a negativní kontroly**

#### **Pozitivní kontrola**

- spermie s halo. SCD protokol, vynechání kroku 8 a 10

#### **Negativní kontrola**

- spermie bez halo. SCD protokol, vynechat krok 8 a 10, po kroku 9 aplikovat na mikrogel 10  $\mu$ l DA (neředěný) a jemně přiložit krycí sklíčko v průběhu 5 min. Pokračovat dle SCD protokolu krokem 11.

(Halosperm: User Manual. Halotech DNA [online])

### **3.2.5 Vyhodnocení**

Získaná data jsme zpracovali v programu Microsoft Excel a z naměřených hodnot SDF% vypočítali střední hodnotu a směrodatnou odchylku.

Pro porovnání dalších sledovaných parametrů – věk, koncentrace, progresivní a celková pohyblivost spermií jsme vypočítali střední hodnoty.

Výsledek těhotenství byl potvrzen pozitivním testem hCG, provedeným 14 dní po embryotransferu a přítomností gestačního váčku 14 dní po odběru krve na hCG. Četnost těhotenství byla zaznamenána pomocí pregnancy rate (PR).

Z naměřených hodnot jsme vytvořili sloupcové grafy znázorňující sledované parametry. Dále byla provedena statistická analýza – chí kvadrát test k srovnání četnosti těhotenství u skupiny s vysokou hladinou SDF a ve skupině s neporušenou integritou DNA.

## 4. Výsledky

### 4.1 Stanovení indexu fragmentace DNA

#### 4.1.1 Soubor

Do souboru jsme zařadili **61** pacientů po opakovaném selhání léčby neplodnosti ve věku 28 – 59 let. U všech jsme stanovili index fragmentace DNA (SDF) viz 3.2.3. K oplodnění *in vitro* byla doporučena metoda PICSI.

U **30%** (18 pacientů) jsme zaznamenali vysoký SDF  $\geq 30\%$  (klinická mez), střední hodnota SDF -25% viz tab. 1.

#### 4.1.2 Věkové skupiny

Soubor jsme rozdělili do 3 věkových kategorií: 28 – 35 let, 36 – 44 let a  $\geq 45$  let. Nejvyšší výskyt poškozené DNA byl ve věkové skupině **36 – 44** let viz graf č. 1.

#### 4.1.3 Standardní parametry

Graf č. 2 znázorňuje rozdíly jednotlivých standardních parametrů spermioqramu (SPG) ve skupině SDF < 30% a SDF  $\geq 30\%$ . U všech kategorií byl zaznamenán pokles středních hodnot. Největší pokles byl u koncentrace spermií – 42%, celkový pohyb klesl o 15,5%, progresivní pohyb se snížil o 6%. Většina SPG byla hodnocena jako astenozoospermie, tudíž nebylo zaznamenáno vážné poškození spermií dle parametrů SPG.

##### Střední hodnoty parametrů SPG:

Koncentrace	<b>50</b> mil./ml (SDF < 30%), <b>29</b> mil./ml (SDF $\geq 30\%$ )
Celkový pohyb	<b>51%</b> (SDF < 30%), <b>35,5%</b> (SDF $\geq 30\%$ )
Progresivní pohyb	<b>16%</b> (SDF < 30%), <b>10%</b> (SDF $\geq 30\%$ )



#### 4.1.4 Četnost těhotenství

Tab. 2 a graf 3 popisuje četnost těhotenství pregnancy rate (PR) u párů v léčbě AR s diagnózou idiopatická neplodnost. Ve skupině s vysokým SDF jsme zaznamenali PR 33%, ve skupině s nepoškozenou integritou DNA PR 19%. Výsledek statistické analýzy (chí – kvadrát test) – rozdíl PR v obou skupinách není statisticky významný s hladinou významnosti 5%.

#### 4.2 Tabulky a grafy

**Tabulka 1: Celkový přehled počtu pacientů s vysokou hodnotou fragmentace DNA spermií a s nepoškozenou integritou DNA**

	28- 35 let	36- 44 let	≥45 let	celkem	celkem %	střední hodnota SDF
SDF <30%	9	27	7	43	70	25
SDF ≥30%	6	8	4	18	30	28
celkem	15	35	11	61		25

SDF = index fragmentace DNA

SDF ≥ 30% = vysoká hodnota fragmentace DNA spermií

**Tabulka 2: Těhotenství u párů s vysokou hodnotou fragmentace DNA spermií, s nepoškozenou integritou DNA, v léčbě neplodnosti s diagnózou idiopatická neplodnost. Oplození in vitro metodou PICSI**

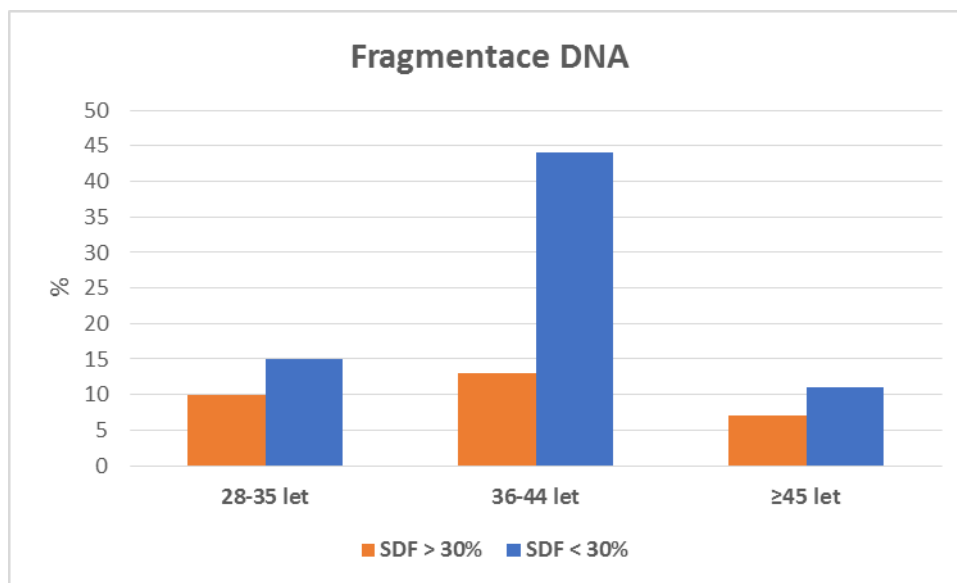
	Pozit. těhot.test	Negat. těhot.test	celkem	PR%
SDF <30%	8	35	43	19
SDF ≥30%	6	12	18	33
P (hodnota)				<b>NS</b>

% PR = pregnancy rate (četnost těhotenství)

statistická analýza – chí kvadrát test,  $P = 0,212166$ ,  $p < 0,05$

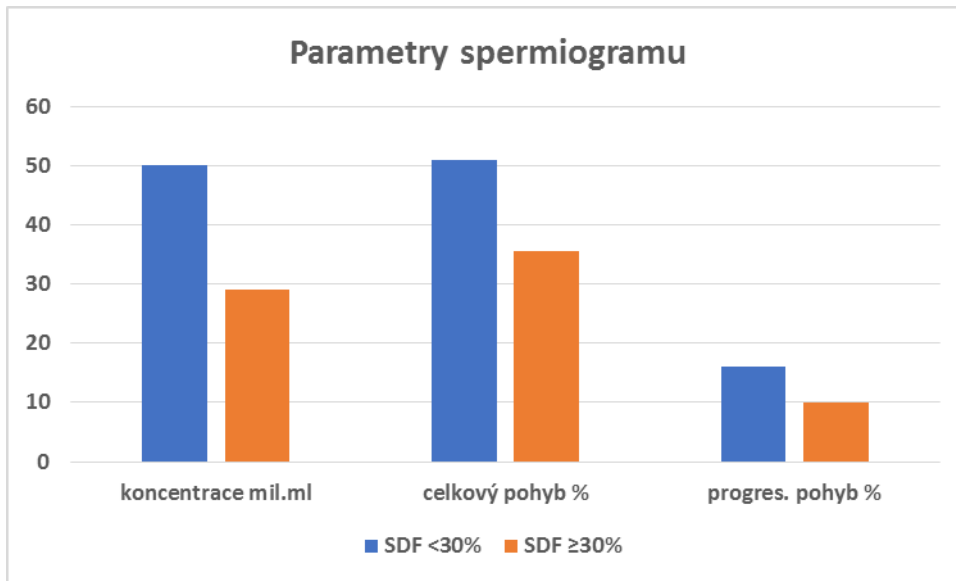
NS – není signifikantní

**Graf 1: Výskyt fragmentace DNA v souboru všech pacientů s diagnózou idiopatická neplodnost, rozdělených do věkových skupin**



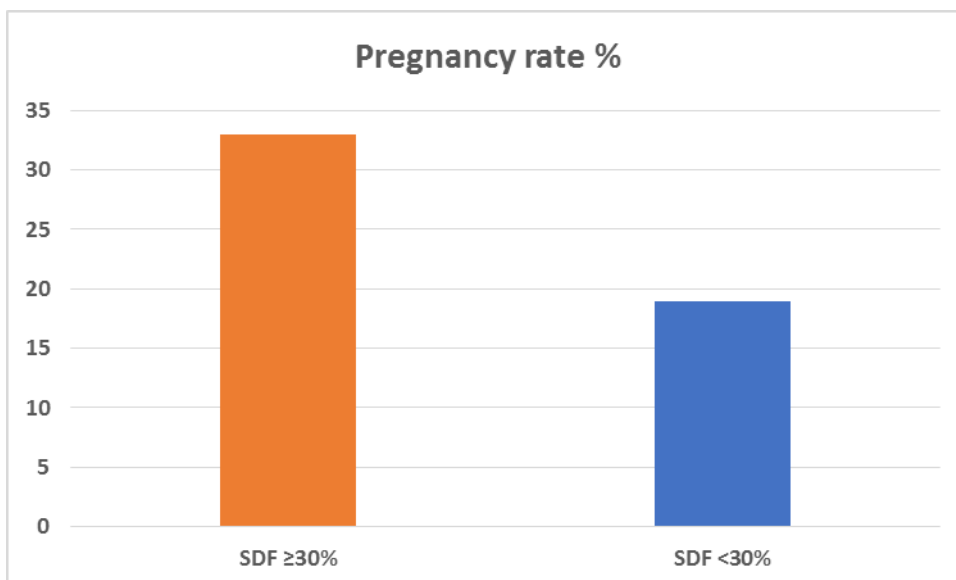
SDF = index fragmentace DNA

**Graf 2: Srovnání standardních parametrů spermiogramu podle výsledku fragmentace DNA u pacientů s diagnózou idiopatická neplodnost**



SDF = index fragmentace DNA

**Graf 3: Pregnancy rate (četnost těhotenství) u párů s vysokou hodnotou fragmentace DNA spermií a s nepoškozenou integritou DNA, v léčbě neplodnosti s diagnózou idiopatická neplodnost**



SDF = index fragmentace DNA

SDF ≥ 30% = vysoká hodnota fragmentace DNA spermií

## 5. Diskuze

Některé studie naznačují negativní korelaci mezi poškozením genomu DNA a fertilizačním potenciálem spermatozoí (Sun *et al.*, 1997, Spano *et al.*, 2000).

Základním předpokladem pro úspěšnou reprodukci je nepoškozená integrita DNA spermií. Integrita DNA je relativně nezávislý parametr kvality spermií a poskytuje doplňující a diagnostické informace odlišné od konvenční analýzy (vyšetření spermioqramu). Mnohé studie potvrdili hodnocení fragmentace DNA jako lepší prognostický marker početí a úspěšného těhotenství (Evenson *et al.*, 2002, Shamsi *et al.*, 2011).

### 5.1 Prediktivní hodnota testů

Prediktivní hodnota testů fragmentace DNA spermií závisí na řadě faktorů. Mezi tyto faktory patří:

- typ poškození DNA (SSB, DSBs)
- procento spermií s poškozením DNA
- rozsah poškození DNA (opravy oocytem)
- kombinované poškození nukleotidů a fragmentace DNA (post testikulární poškození)
- poměr poškození intronů a exonů (fragmentace DNA v neaktivní části genomu není tak škodlivá jako v aktivní oblasti)
- schopnost oocyty opravit poškození DNA během oplodnění (nelze diagnostikovat)
- typ testu stanovení fragmentace DNA
- metody zpracování spermií v asistované reprodukci (poškození kryokonzervací, centrifugací)
- počet oocytů získaných metodami AR (vyšší počet oocytů zvyšuje pravděpodobnost otěhotnění)  
(Sakkas *et al.*, 2010)

Ve studii z roku 2008 Collins et. al. uvádí „malou“, ale statisticky významnou souvislost mezi výsledky zkoušek integrity DNA spermií a těhotenstvím v IVF. Nicméně tento vztah není dostatečný pro klinickou indikaci těchto testů k rutinnímu použití. Je možné, že se budou muset stanovit podskupiny neplodných párů, vzhledem k celé řadě faktorů uvedených výše, které mohou ovlivnit prediktivní hodnotu testů fragmentace DNA spermií. Ukazuje se jako důležité umět posoudit, zda poškození DNA spadá do skupiny opravitelných či neopravitelných defektů DNA, což ovlivňuje prognózu na úspěšné těhotenství. Klinické hodnoty testované fragmentace DNA v predikci výsledku těhotenství v IVF by měly být založeny na dvou hlavních předpokladech: zda má poškození DNA vliv na celou populaci spermií ve vzorku a zda poškození DNA v těchto spermiích může být opraveno v oocytech (Sakkas et al., 2010).

## ***5.2 Nové techniky výběru spermií***

V současné době byla navržena celá řada technik, které umožňují vybrat spermii s nižší mírou fragmentace DNA. Jednou z možností je metoda PICSI, při které lze vybrat zralé spermie, kde se předpokládá přítomnost nepoškozené DNA. Principem metody je specifická vazba pouze zralých spermií na gel hyaluronanu (PICSI for Sperm Selection. Origio, 2013 [online]).

## ***5.3 Závěry a budoucí směry***

Neplodnost je významný problém týkající se přibližně 20% mužů západních zemí. Nedostatky meiotické rekombinace i protaminace mohou způsobit dvouvláknové zlomy DNA. Je pravděpodobné, že některé reakce vyvolané poškozením DNA spermií mohou způsobit neplodnost (González-Marín et al., 2012).

V posledních dvou desetiletích probíhají rozsáhlé studie zaměřené na pochopení mechanismů opravy poškozené DNA. Experimenty prováděné na jednobuněčných eukaryotních buňkách *Saccharomyces cerevisiae*, jakož i na zvířecích modelech a citlivých buněčných liniích, umožňují pochopit funkce různých kontrolních bodů,

mediátorů a efektorů, stejně jako jejich vztah s proteinovými faktory, které se účastní různých mechanismů opravy DNA. Ale prozatím máme málo informací o možnostech opravy v zárodečné buněčné linii.

Další studie zaměřené tímto směrem, nám mohou umožnit lépe porozumět mechanismům opravy poškozené DNA spermií a mohly by být základem pro efektivní prevenci a léčbu neplodnosti.

Hodnocení indexu fragmentace (SDF) DNA spermií je považováno za přínosné. Prozatím je však nedostatek standardizovaných testů a protokolů, které by vedly k přijetí všeobecně platných klinických mezí. Jedním z cílů v budoucnosti je pochopení role SDF na reprodukci a zkoumání kapacity oocytu opravit poškozené spermie (González-Marín et al., 2012). Jako důležité se ukazuje vyvinout nové testy orientované na nedestruktivní stanovení reprodukčního potenciálu spermií, které by umožnily použít stejnou zárodečnou buňku pro fertilizaci. To by zajistilo bezpečnou a efektivní diagnostiku v případě rozhodnutí pro asistovanou reprodukci (Shamsi et al., 2011).

## 6. Závěr

V bakalářské práci jsem se pokusila o shrnutí příčin vzniku poškození jaderné DNA spermií a souhrn metod k vyšetření fragility DNA.

V praktické části popisuji aplikaci metody s firemním názvem Halosperm, založené na disperzi chromatinu spermií.

Metodu firmy Halotech DNA – Halosperm jsme se rozhodli zavést na našem pracovišti k usnadnění výběru techniky IVF a k zvýšení úspěšnosti léčby neplodnosti.

Doposud jsme vyšetřili touto metodou 61 pacientů. Sledovaný soubor můžeme zahrnout do skupiny s idiopatickou neplodností vzhledem k opakovanému selhání léčby. U 30% pacientů jsme tímto testem potvrdili silné poškození integrity DNA ( $SDF \geq 30\%$ ). Nejvyšší výskyt poškozené DNA byl ve věkové skupině 36 – 44 let.

Při srovnání standardních parametrů spermioqramu (SPG) – koncentrace, celkový a progresivní pohyb ve skupině s normální hodnotou fragmentace DNA ( $SDF < 30\%$ ) a s abnormální hodnotou ( $SDF \geq 30\%$ ), jsme pozorovali pokles středních hodnot u všech parametrů SPG. Největší pokles 42%, byl zaznamenán u koncentrace spermií.

Přesto většina SPG byla hodnocena jako astenozoospermie, tudíž nebylo zaznamenáno vážné poškození spermií dle parametrů SPG.

U pacienta v léčbě paroxetinem (antidepresivum) jsme určili vysokou míru fragmentace DNA. Toto zjištění koresponduje se studií, která upozorňuje na nepříznivé působení tohoto léku na spermie u významného podílu pacientů (Tanrikut et al., 2010). K oplodnění *in vitro* byla doporučena metoda PICSi, při které lze vybrat zralé nepoškozené spermie.

Pregnancy rate (PR) u párů v léčbě AR s diagnózou idiopatická neplodnost jsme posuzovali ve skupině s vysokým SDF ( $\geq 30\%$ ), kde jsme zaznamenali PR 33%. Ve skupině s neporušenou integritou DNA, kde zůstávají nadále nezjištěné příčiny snížené fertilizační schopnosti spermií byla PR 19%. Rozdíl PR v obou skupinách není statisticky významný s hladinou významnosti 5%.

Celkové výsledky mohou být ovlivněny malým souborem dat. Míra pregnancy rate může být ovlivněna kombinací mužských i ženských příčin neplodnosti. Nadále bychom chtěli pokračovat v testování pacientů metodou Halosperm a provést novou analýzu výsledků s větším počtem vzorků. Při použití techniky PICSi k oplodnění *in vitro* je na zvážení, zda vyšetření fragmentace DNA spermií může vést ke zvýšení kvality péče o naše pacienty.

## 7. Seznam obrázků, tabulek a grafů

### Obrázky:

Obrázek 1: Hlavní příčiny poškození DNA ve spermiích .....	10
Obrázek 2: Test Halosperm.....	16
Obrázek 3: Halo efekt .....	23

### Tabulky:

Tabulka 1: Celkový přehled počtu pacientů s vysokou hodnotou fragmentace DNA spermií a s nepoškozenou integritou DNA .....	26
Tabulka 2: Těhotenství u párů s vysokou hodnotou fragmentace DNA spermií a s nepoškozenou integritou DNA, v léčbě neplodnosti s diagnózou idiopatická neplodnost. Oplodnění in vitro metodou PICS1 .....	27

### Grafy:

Graf 1: Výskyt fragmentace DNA v souboru všech pacientů s diagnózou idiopatická neplodnost, rozdělených do věkových skupin.....	27
Graf 2: Srovnání standardních parametrů spermogramu podle výsledku fragmentace DNA u pacientů s diagnózou idiopatická neplodnost.....	28
Graf 3: Pregnancy rate (četnost těhotenství) u párů s vysokou hodnotou fragmentace DNA spermií a s nepoškozenou integritou DNA, v léčbě neplodnosti s diagnózou idiopatická neplodnost .....	28



## 8. Literatura a zdroje informací

About us. *Halotech DNA* [online]. Madrid: Parque Científico de Madrid, C, © 2010 [cit. 2014-12-26]. Dostupné z: <http://www.halotechdna.com/about-us/>

Advantages of halosperm. *Halotech DNA* [online]. Madrid: Parque Científico de Madrid, C, © 2010 [cit. 2014-12-26]. Dostupné z: [http://www.halotechdna.com/wp-content/uploads/2014/11/halosperm\\_web\\_eng.pdf](http://www.halotechdna.com/wp-content/uploads/2014/11/halosperm_web_eng.pdf)

AGARWAL, A. Role of sperm chromatin abnormalities and DNA damage in male infertility. *Human Reproduction Update*. 2003-07-01, vol. 9, issue 4, s. 331-345. DOI: 10.1093/humupd/dmg027. Dostupné z: <http://humupd.oupjournals.org/cgi/doi/10.1093/humupd/dmg027>

AITKEN, R. J. Relative Impact of Oxidative Stress on the Functional Competence and Genomic Integrity of Human Spermatozoa. *Biology of Reproduction*. 1998, vol. 59, issue 5, s. 1037-1046. DOI: 10.1095/biolreprod59.5.1037.

AITKEN, R. J., K. T. JONES a S. A. ROBERTSON. Reactive Oxygen Species and Sperm Function--In Sickness and In Health. *Journal of Andrology*. 2012-11-29, vol. 33, issue 6, s. 1096-1106. DOI: 10.2164/jandrol.112.016535. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.2164/jandrol.112.016535>

AITKEN, Robert J. a Benjamin J. CURRY. Redox Regulation of Human Sperm Function: From the Physiological Control of Sperm Capacitation to the Etiology of Infertility and DNA Damage in the Germ Line. *Antioxidants*. 2011, vol. 14, issue 3, s. 367-381. DOI: 10.1089/ars.2010.3186. Dostupné z: <http://www.liebertonline.com/doi/abs/10.1089/ars.2010.3186>

BADOUARD, C., Y. MÉNÉZO, G. PANTEIX, J.L. RAVANAT, T. DOUKI, J. CADET a A. FAVIER. Determination of new types of DNA lesions in human sperm. *Zygote*. 2008, vol. 16, issue 01, s. 9-13. DOI: 10.1017/S0967199407004340. Dostupné z: [http://www.journals.cambridge.org/abstract\\_S0967199407004340](http://www.journals.cambridge.org/abstract_S0967199407004340)

BELLOC, Stéphanie, Moncef BENKHALIFA, Anne Marie JUNCA, Martine DUMONT, Paul Cohen BACRIE a Yves MÉNÉZO. Paternal age and sperm DNA decay: discrepancy between chromomycin and aniline blue staining. *Reproductive BioMedicine Online*. 2009, vol. 19, issue 2, s. 264-269. DOI: 10.1016/s1472-6483(10)60083-1.

BENNETTS, L.E., G.N. DE IULIIS, B. NIXON, M. KIME, K. ZELSKI, C.M. MCVICAR, S.E. LEWIS a R.J. AITKEN. Impact of estrogenic compounds on DNA integrity in human spermatozoa: Evidence for cross-linking and redox cycling activities. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*. 2008, vol. 641, 1-2, s. 1-11. DOI: 10.1016/j.mrfmmm.2008.02.002. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0027510708000377>

BORMANN, C.L., A.M. ROCHA, P.A. HASSUN, E.L.A. MOTTA, P. SERAFINI a G.D. SMITH. The effect of sperm separation on sperm chromatin decondensation and motility at 0 and 24 hours of culture. *Fertility and Sterility*. 2008, vol. 90, s. 452-453. DOI: 10.1016/j.fertnstert.2008.07.820. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0015028208030598>

BURRELLO, N. Morphologically normal spermatozoa of patients with secretory oligo-astheno-teratozoospermia have an increased aneuploidy rate. *Human Reproduction*. 2004-08-27, vol. 19, issue 10, s. 2298-2302. DOI: 10.1093/humrep/deh438. Dostupné z: <http://humrep.oxfordjournals.org/lookup/doi/10.1093/humrep/deh438>

CARRELL, D.T. a L. LIU. 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*. 2001, roč. 22, č. 4, s. 604-610. Dostupné z: <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/j.1939-4640.2001.tb02220.x/pdf>

COLLINS, John A., Kurt T. BARNHART, Peter N. SCHLEGEL, Jan TESARIK a Armand ZINI. Do sperm DNA integrity tests predict pregnancy with in vitro fertilization?: Biological and Clinical Considerations. *Fertility and Sterility*. 2008, vol. 89, issue 4, s. 499-504. DOI: 10.1007/978-1-4419-6857-9\_37.

CONWELL, C. C., I. D. VILFAN a N. V. HUD. Controlling the size of nanoscale toroidal DNA condensates with static curvature and ionic strength. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2011-05-01, vol. 100, issue 16, s. 9296-9301. DOI: 10.1073/pnas.1533135100. Dostupné z: <http://www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.1533135100>

DE IULIIS, G. N., L. K. THOMSON, L. A. MITCHELL, J. M. FINNIE, A. J. KOPPERS, A. HEDGES, B. NIXON a R. J. AITKEN. DNA Damage in Human Spermatozoa Is Highly Correlated with the Efficiency of Chromatin Remodeling and the Formation of 8-Hydroxy-2'-Deoxyguanosine, a Marker of Oxidative Stress. *Biology of Reproduction*. 2009-08-25, vol. 81, issue 3, s. 517-524. DOI: 10.1095/biolreprod.109.076836. Dostupné z: <http://www.biolreprod.org/cgi/doi/10.1095/biolreprod.109.076836>

DE JONGE, Christopher, Marie LAFROMBOISE, Eugene BOSMANS, Willem OMBELET, Annemie COX a Martine NIJS. Influence of the abstinence period on human sperm quality. *Fertility and Sterility*. 2004, vol. 82, issue 1, s. 57-65. DOI: 10.1016/j.fertnstert.2004.03.014. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0015028204006053>

DE LAMIRANDE, E., M. C. SAN GABRIEL a A. ZINI. Human Sperm Chromatin Undergoes Physiological Remodeling During In Vitro Capacitation and Acrosome Reaction. *Journal of Andrology*. 2012-09-19, vol. 33, issue 5, s. 1025-1035. DOI: 10.2164/jandrol.111.015982. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.2164/jandrol.111.015982>

EVENSON, D., Z DARZYNKIEWICZ a M. MELAMED. Relation of mammalian sperm chromatin heterogeneity to fertility. *Science*. 1980, vol. 210, issue 4474, s. 1131-1133. DOI: 10.1126/science.7444440.  
EVENSON, D.P. Utility of the sperm chromatin structure assay as a diagnostic and prognostic tool in the human fertility clinic. *Human Reproduction*. 1999, vol. 14, issue 4, s. 1039-1049. DOI: 10.1093/humrep/14.4.1039.

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

FERNANDEZ, J, L MURIEL, V GOYANES, E SEGRELLES, J GOSALVEZ, M ENCISO, M LAFROMBOISE a C DEJONGE. Simple determination of human sperm DNA fragmentation with an improved sperm chromatin dispersion test. *Fertility and Sterility*. 2005, vol. 84, issue 4, s. 833-842. DOI: 10.1016/j.fertnstert.2004.11.089. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0015028205027780>

FERNÁNDEZ, J.L., L. MURIEL, M.T. RIVERO, V. GOYANES, R. VAZQUEZ a J.G. ALVAREZ. The Sperm Chromatin Dispersion Test: A Simple Method for the Determination of Sperm DNA Fragmentation. *Journal of Andrology*. 2003, roč. 24, č. 1, 1-66. Dostupné z: <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/j.1939-4640.2003.tb02641.x/pdf>

FERNÁNDEZ, José Luis, Dioleyda CAJIGAL, Carmen LÓPEZ-FERNÁNDEZ a Jaime GOSÁLVEZ. Assessing Sperm DNA Fragmentation with the Sperm Chromatin Dispersion Test. *Methods Mol. Biol.* 2011, s. 291. DOI: 10.1007/978-1-60327-409-8\_21. Dostupné z: [http://link.springer.com/10.1007/978-1-60327-409-8\\_21](http://link.springer.com/10.1007/978-1-60327-409-8_21). Abstrakt databáze PubMed

G. FUENTES-MASCORRO, H. SERRANO, A. SPERM CHROMATIN. *Systems Biology in Reproductive Medicine*. 2000, vol. 45, issue 3, s. 215-225. DOI: 10.1080/01485010050193995. Dostupné z: <http://informahealthcare.com/doi/abs/10.1080/01485010050193995>

GALLEGOS, Guadalupe, Benito RAMOS, Rebeca SANTISO, Vicente GOYANES, Jaime GOSÁLVEZ a José Luis FERNÁNDEZ. Sperm DNA fragmentation in infertile men with genitourinary infection by Chlamydia trachomatis and Mycoplasma. *Fertility and Sterility*. 2008, vol. 90, issue 2, s. 328-334. DOI: 10.1016/j.fertnstert.2007.06.035. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0015028207013787>

GARCÍA-PEIRÓ, Agustín, Juan MARTÍNEZ-HEREDIA, María OLIVER-BONET, Carlos ABAD, María José AMENGUAL, Joaquina NAVARRO, Celine JONES, Kevin COWARD, Jaime GOSÁLVEZ a Jordi BENET. Protamine 1 to protamine 2 ratio correlates with dynamic aspects of DNA fragmentation in human sperm. *Fertility and Sterility*. 2011, vol. 95, issue 1, s. 105-109. DOI: 10.1016/j.fertnstert.2010.06.053. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S001502821001006X>

GATEWOOD, J.M., G.R. COOK, R. BALHORN, C.W. SCHMID a E.M. BRADBURY. Isolation of four core histones from human sperm chromatin representing a minor subset of somatic histones. *J. Biol. Chemistry*. 1990, č. 33, 265, 20662-20666. Dostupné z: <http://www.jbc.org/content/265/33/20662.full.pdf+html>

GIL-GUZMAN, E. Differential production of reactive oxygen species by subsets of human spermatozoa at different stages of maturation. *Human Reproduction*. 2001, vol. 16, issue 9, s. 1922-1930. DOI: 10.1093/humrep/16.9.1922. Dostupné z: <http://humrep.oxfordjournals.org/lookup/doi/10.1093/humrep/16.9.1922>

GODEAS, C. Distribution and possible novel role of phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase in rat epididymal spermatozoa. *Biology of Reproduction*. 1997-12-01, vol. 57, issue 6, s. 1502-1508. DOI: 10.1095/biolreprod57.6.1502. Dostupné z: <http://www.biolreprod.org/cgi/doi/10.1095/biolreprod57.6.1502>

GONZÁLEZ-MARÍN, Clara, Jaime GOSÁLVEZ a Rosa ROY. Types, Causes, Detection and Repair of DNA Fragmentation in Animal and Human Sperm Cells. *International Journal of Molecular Sciences*. 2012, vol. 13, issue 12, s. 14026-14052. DOI: 10.3390/ijms131114026. Dostupné z: <http://www.mdpi.com/1422-0067/13/11/14026/>

GOSÁLVEZ, Jaime, Carmen LÓPEZ-FERNÁNDEZ, José L. FERNÁNDEZ, Anne GOURAUD a William V. HOLT. Relationships between the dynamics of iatrogenic DNA damage and genomic design in mammalian spermatozoa from eleven species. *Molecular Reproduction and Development*. 2011, vol. 78, issue 12, s. 951-961. DOI: 10.1002/mrd.21394. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1002/mrd.21394>

GOSÁLVEZ, Jaime, Joaquina DE LA TORRE, Carmen LÓPEZ-FERNÁNDEZ, Laura PÉREZ-GUTIÉRREZ, Leonor ORTEGA, Pedro CABALLERO a Rocio NUÑEZ. DNA Fragmentation Dynamics in Fresh Versus Frozen Thawed Plus Gradient-Isolated Human Spermatozoa. *Systems Biology in Reproductive Medicine*. 2010, vol. 56, issue 1, s. 27-36. DOI: 10.3109/19396360903515430. Dostupné z: <http://informahealthcare.com/doi/abs/10.3109/19396360903515430>

GOSÁLVEZ, Jaime, Mercedes GONZÁLEZ-MARTÍNEZ, Carmen LÓPEZ-FERNÁNDEZ, José L. FERNÁNDEZ a Pascual SÁNCHEZ-MARTÍN. Shorter abstinence decreases sperm deoxyribonucleic acid fragmentation in ejaculate. *Fertility and Sterility*. 2011, vol. 96, issue 5, s. 1083-1086. DOI: 10.1016/j.fertnstert.2011.08.027. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0015028211024721>

Halosperm: User Manual. *Halotech DNA* [online]. Spain: Parque Científico de Madrid, C, © 2010 [cit. 2014-12-27]. Dostupné z: <http://www.halotechdna.com/wp-content/uploads/2014/10/IUhalosperm-eng.pdf>  
<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S007476960861061X>

IRVINE, DS. DNA Integrity in Human Spermatozoa: Relationships With Semen Quality: Relationships with semen quality. *Journal of andrology*. 2000, vol. 21, issue 1, s. 33-34. Dostupné z: <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/j.1939-4640.2000.tb03273.x/abstract>

JACKSON, Robert E., Charles L. BORMANN, Pericles A. HASSUN, André M. ROCHA, Eduardo L.A. MOTTA, Paulo C. SERAFINI a Gary D. SMITH. Effects of semen storage and separation techniques on sperm DNA fragmentation. *Fertility and Sterility*. 2010, vol. 94, issue 7, s. 2626-2630. DOI: 10.1016/j.fertnstert.2010.04.049. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0015028210006709>

JAGER, S. Sperm Nuclear Stability and Male Infertility. *Systems Biology in Reproductive Medicine*. 1990, vol. 25, issue 3, s. 253-259. DOI: 10.3109/01485019008987614. Dostupné z: <http://informahealthcare.com/doi/abs/10.3109/01485019008987614>

JAYARAMAN, Varshini, Dinesh UPADHYA, Pratap Kumar NARAYAN a Satish Kumar ADIGA. Sperm processing by swim-up and density gradient is effective in elimination of sperm with DNA damage. *Journal of Assisted Reproduction and Genetics*. 2012, vol. 29, issue 6, s. 557-563. DOI: 10.1007/s10815-012-9742-x. Dostupné z: <http://link.springer.com/10.1007/s10815-012-9742-x>

Kruger, T.F. Sperm decondensation and semen parameters: Utilization of a simple staining technique for the evaluation of human sperm decondensation. *Andrologia* **1994**, 26, 67-72.

MENGUAL, LOURDES, JOSÉ L. BALLESCA, CARLOS ASCASO a RAFAEL OLIVA. Marked Differences in Protamine Content and P1/P2 Ratios in Sperm Cells From Percoll Fractions Between Patients and Controls. *Journal of*

*Andrology*. 2003, roč. 24, č. 3. Dostupné z: <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/j.1939-4640.2003.tb02692.x/pdf>

NIJS, M., C. DE JONGE, A. COX, M. JANSSEN, E. BOSMANS a W. OMBELET. Correlation between male age, WHO sperm parameters, DNA fragmentation, chromatin packaging and outcome in assisted reproduction technology. *Andrologia*. 2011, vol. 43, issue 3, s. 174-179. DOI: 10.1111/j.1439-0272.2010.01040.x. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1111/j.1439-0272.2010.01040.x>

OLIVA, R. Protamines and male infertility. *Human Reproduction Update*. 2006-03-24, vol. 12, issue 4, s. 417-435. DOI: 10.1093/humupd/dml009. Dostupné z: <http://humupd.oxfordjournals.org/cgi/doi/10.1093/humupd/dml009>

PAUL, C., A. A MURRAY, N. SPEARS a P. T K SAUNDERS. A single, mild, transient scrotal heat stress causes DNA damage, subfertility and impairs formation of blastocysts in mice. *Reproduction*. 2008, vol. 136, issue 1, s. 73-84. DOI: 10.1530/rep-08-0036.

PELUSO, Giuseppina, Alessandro PALMIERI, Pietro Paolo COZZA, Giancarlo MORRONE, Paolo VERZE, Nicola LONGO a Vincenzo MIRONI. The study of spermatid DNA fragmentation and sperm motility in infertile subjects. *Archivio Italiano di Urologia e Andrologia*. 2013-04-19, vol. 85, issue 1, s. -. DOI: 10.4081/aiua.2013.1.8. Dostupné z: <http://www.pagepressjournals.org/index.php/aiua/article/view/1584>

PICSI for Sperm Selection. *Origio* [online]. Denmark: Knardrupvej and Måløv Byvej, 2013.07.01 [cit. 2014-12-26]. Dostupné z: <http://www.origio.com/products/midatlantic%20devices/picsi.aspx>

POCCIA, D. Remodeling of nucleoproteins during gametogenesis, fertilization, and early development. *International review of cytology*, 1986, Vol.105, pp.1-65 [online]. 1986, vol. 105, s.1-65[cit.2014-09-27].DOI:3539853.Dostupné z:

RUBES, Jiri, Sherry G. SELEVAN, Radim J. SRAM, Donald P. EVENSON a Sally D. PERREAULT. GSTM1 genotype influences the susceptibility of men to sperm DNA damage associated with exposure to air pollution. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*. 2007, vol. 625, 1-2, s. 20-28. DOI: 10.1016/j.mrfmmm.2007.05.012.

SAKKAS, D. Origin of DNA damage in ejaculated human spermatozoa. *Reviews of Reproduction*. 1999, vol. 4, issue 1, s. 31-37. DOI: 10.1530/revreprod/4.1.31.

SAKKAS, Denny a Juan G. ALVAREZ. Sperm DNA fragmentation: mechanisms of origin, impact on reproductive outcome, and analysis. *Fertility and Sterility*. 2010, vol. 93, issue 4, s. 1,1027-1036.DOI:10.1016/j.fertnstert.2009.10.046.Dostupné z:<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0015028209039661>

SAKKAS, Denny, Emre SELI, Gian Carlo MANICARDI, Martine NIJS, William OMBELET a Davide BIZZARO. The presence of abnormal spermatozoa in the ejaculate: Did apoptosis fail?. *Human Fertility*. 2004, vol. 7, issue 2, s. 99-103. DOI: 10.1080/14647270410001720464. Dostupné z: <http://informahealthcare.com/doi/abs/10.1080/14647270410001720464>

SALEH, Ramadan A, Ashok AGARWAL, David R NELSON, Essam A NADA, Mohammed H EL-TONSY, Juan G ALVAREZ, Anthony J THOMAS a Rakesh K SHARMA. Increased sperm nuclear DNA damage in normozoospermic infertile men: a prospective study. *Fertility and Sterility*. 2002, vol. 78, issue 2, s. 313-318. DOI: 10.1016/S0015-0282(02)03219-3. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0015028202032193>

SHAMSI, Monis Bilal, Syed Nazar IMAM a Rima DADA. Sperm DNA integrity assays: diagnostic and prognostic challenges and implications in management of infertility. *Journal of Assisted Reproduction and Genetics*. 2011, vol. 28, issue 11, s. 1073-1085. DOI: 10.1007/s10815-011-9631-8. Dostupné z: <http://link.springer.com/10.1007/s10815-011-9631-8>

SIMON, Luke, Judit CASTILLO, Rafael OLIVA a Sheena E.M. LEWIS. Relationships between human sperm protamines, DNA damage and assisted reproduction outcomes. *Reproductive BioMedicine Online*. 2011, vol. 23, issue 6, s. 724-734. DOI: 10.1016/j.rbmo.2011.08.010. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1472648311004822>

SINGH, Narendra P., Michael T. MCCOY, Raymond R. TICE a Edward L. SCHNEIDER. A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. *Experimental Cell Research*. 1988, vol. 175, issue 1, s. 184-191. DOI: 10.1016/0014-4827(88)90265-0.

Spano, M., Bonde, J.P., Hjollund, H.I., Kolstad, H.A., Cordelli, E. and Leter, G. (2000) Sperm chromatin damage impairs human fertility. *Fertil.Steril.*, 73, 43-50.

Sun, J.G., Jurisicova, A. and Casper, R.F. (1997) Deletion of deoxyribonucleic acid fragmentation in human sperm: correlation with fertilization in vitro. *Biol. Reprod.*, 56, 602-607.

TALEBI, A. R., M. R. MOEIN, N. TABIBNEJAD a J. GHASEMZADEH. Effect of varicocele on chromatin condensation and DNA integrity of ejaculated spermatozoa using cytochemical tests. *Andrologia*. 2008, vol. 40, issue 4, s. 245-251. DOI: 10.1111/j.1439-0272.2008.00852.x. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1111/j.1439-0272.2008.00852.x>

TANRIKUT, Cigdem, Adam S. FELDMAN, Margaret ALTEMUS, Darius A. PADUCH a Peter N. SCHLEGEL. Adverse effect of paroxetine on sperm. *Fertility and Sterility*. 2010, vol. 94, issue 3, s. 1021-1026. DOI: 10.1016/j.fertnstert.2009.04.039. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0015028209010073>

VAGNINI, L, RLR BARUFFI, AL MAURI, CG PETERSEN, FC MASSARO, A PONTES, JBA OLIVEIRA a JG FRANCO. The effects of male age on sperm DNA damage in an infertile population. *Reproductive BioMedicine Online*. 2007, vol. 15, issue 5, s. 514-519. DOI: 10.1016/s1472-6483(10)60382-3.

*WHO laboratory manual for the examination and processing of human semen*. 5th ed. Geneva: World Health Organization, c2010, xiv, 271 p. ISBN 92-415-4778-2. Dostupné z: <http://www.who.int/reproductivehealth/publications/infertility/9789241547789/en/>

Windt, M.L.; de Beer, P.M.; Franken, D.R.; Rhemrev, J.; Menkveld, R.; Lombard, C.J.;

WINKLE, Thomas, Bernd ROSENBUSCH, Friedrich GAGSTEIGER, Thomas PAISS a Nicole ZOLLER. The correlation between male age, sperm quality and sperm DNA fragmentation in 320 men attending a fertility center. *Journal of Assisted Reproduction and Genetics*. 2008, vol. 26, issue 1, s. 41-46. DOI: 10.1007/s10815-008-9277-3

Zini, A., Kamal, K., Phang, D., Willis, J. and Jarvi, K. (2001a) Biologic variability of sperm DNA denaturation in infertile men. *Urology*, 58, 258-261

ZINI, Armand a Gert DOHLE. Are varicoceles associated with increased deoxyribonucleic acid fragmentation?. *Fertility and Sterility*. 2011, vol. 96, issue 6, s. 1283-1287. DOI: 10.1016/j.fertnstert.2011.10.016. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0015028211027014>