

УДК 57.086.13:591.463.11.085

Т.О. Юрчук*, О.В. Павлович, М.П. Петрушко

Кріпошкодження цілісності ДНК сперматозоїдів свійських тварин: методи визначення і шляхи підвищення цілісності ДНК

UDC 57.086.13:591.463.11.085

T.O. Yurchuk*, O.V. Pavlovych, M.P. Petrushko

Sperm DNA Cryodamage in Domestic and Farm Animals: Detection Methods and Ways of DNA Integrity Improvement

Реферат: У огляді представлено дані щодо впливу кріоконсервування на стан ДНК сперматозоїдів свійських тварин, описано основні причини фрагментації ДНК, методи визначення та способи збереження її цілісності. Показано, що наявні методи визначення фрагментації ДНК є досить ефективними, але вибір оптимального методу обумовлений видовою приналежністю тварини. Основним чинником кріпошкодження ДНК визнано оксидативний стрес, спричинений підвищеним вмістом активних форм кисню. Для запобігання даного ефекту розроблено багато захисних середовищ та реабілітаційних розчинів з додаванням антиоксидантів (неферментні, ферментні сполуки та наночастинки). Таким чином, визначення рівня фрагментації ДНК сперматозоїдів та збереження її цілісності є необхідною складовою для підвищення ефективності кріоконсервування гамет свійських тварин, що є складовою репродуктивних технологій.

Ключові слова: кріоконсервування сперматозоїдів, фрагментація ДНК, сперматозоїди свійських тварин, оксидативний стрес, антиоксиданти.

Abstract: Here, we have presented the data describing the cryopreservation impact on DNA status of domestic and farm animal sperm, and described the main causes of DNA fragmentation and methods of its detection and DNA integrity preservation. The current methods to identify the DNA fragmentation rate have been shown to be quite efficient, but the choice for the optimal way is stipulated by animal species. The oxidative stress caused by an increased content of reactive oxygen species was recognized as the main mechanism in DNA cryodamage. To prevent this negative effect on germ genetic material, many protective media and rehabilitation solutions supplemented with antioxidants (non-enzymatic, enzymatic compounds and nanoparticles) have been developed. Thus, determining the sperm DNA fragmentation rate and maintaining its integrity are the necessary steps to improve the efficiency of domestic animal gamete cryopreservation as a part of reproductive technologies.

Key words: sperm cryopreservation, DNA fragmentation, sperm of domestic animals, oxidative stress, antioxidants.

Кріоконсервування сперматозоїдів є широковживаним та ефективним методом зберігання гермплазми тварин для подальшого відтворення поголів'я та виведення нових порід. Кріоконсервування сперматозоїдів (КС) пов'язане з різними методами допоміжних репродуктивних технологій, що застосовуються для розведення тварин цінних сільськогосподарських порід та тих, які знаходяться на межі зникнення [27]. Перший звіт про спроби кріоконсервування сперми належить італійському священику та фізіологу L. Spallanzani, який намагався заморозити сперму за допомогою снігу (1776 р.) і вперше здійснив успішне штучне осіменіння собаки в 1785 р. [9]. З того часу було розроблено методи кріоконсервування сперматозоїдів багатьох інших видів тварин: вівці, барана, крупної рогатої худоби, кроля тощо. Використання яєчного жовтка з метою уникнення або зниження ефекту холодового шоку стало важливим кроком для широкого застосу-

Sperm cryopreservation (SC) is the widely used and efficient tool for animal germplasm storage, future livestock reproduction and development of new breeds. SC is associated with various techniques of assisted reproductive technologies used to develop the valuable and endangered breeds in animal agriculture [27]. The first report on the attempts to cryopreserve sperm belongs to the Italian priest and physiologist L. Spallanzani, who tried to freeze sperm by means of snow (1776) and first performed the successful artificial insemination in a dog in 1785 [9]. Since then, there have been developed the cryopreservation techniques for semen of many other animal species such as: sheep, ram, cattle, rabbit, *etc.* The use of egg yolk either to avoid or reduce the cold shock effect became an important step for a widespread use of cooled semen [52]. A. Bernstein *et al.* [7] were the first to show the possibility of using glycerol solution for SC in mammals

Інститут проблем кріобіології і кріомедицини НАН України, м. Харків

Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine of the National Academy of Sciences of Ukraine, Kharkiv, Ukraine

*Автор, якому необхідно надсилати кореспонденцію:

вул. Переяславська, 23, м. Харків, Україна 61016;
тел.: (+38 057) 373-74-35, факс: (+38 057) 373-59-52
електронна пошта: taisiya.yur@gmail.com

*To whom correspondence should be addressed:

23, Pereyaslavska str., Kharkiv, Ukraine 61016;
tel.: +380 57 373 7435, fax: +380 57 373 5952
e-mail: taisiya.yur@gmail.com

Надійшла 28.10. 2021

Прийнята до друку 18.05.2022

Received 28, October, 2021

Accepted 18, May, 2022

© 2022 T.O. Yurchuk, *et al.* Published by the Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine

This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0>), which permits unrestricted reuse, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

вання охолодженої сперми [52]. А. Бернштейн та співавт. [1] першими показали можливість використання розчину гліцерину для КС ссавців (бик, кабан, морська свинка, кролик, баран, жеребець) та птиці (качка) [44, 45]. Основними критеріями результативності штучного осіменіння при використанні кріоконсервованої сперми тварин є життєздатність і рухливість гамет [43]. Однак саме цілісність молекули ДНК має визначальну роль для проведення таких репродуктивних технологій, як штучне осіменіння, запліднення *in vitro* (IVF) та інтрацитоплазматичне введення сперматозоїда в ооцит (ICSI), оскільки доказано взаємозв'язок між рівнем фрагментації ДНК сперматозоїдів та розвитком ембріонів *in vitro* [63]. У зв'язку з цим оцінка якості кріоконсервованих сперматозоїдів повинна ґрунтуватися на визначенні рівня фрагментації ДНК.

Мета роботи — систематизація результатів досліджень впливу кріоконсервування на стан ДНК сперматозоїдів свійських тварин і визначення основних чинників, які впливають на фрагментацію ДНК та її цілісність.

Методи дослідження фрагментації ДНК сперматозоїдів. Серед найбільш поширених методів оцінки рівня фрагментації ДНК, зазвичай, виділяють наступні: прямі — аналіз структури хроматину сперматозоїдів (SCSA), аналіз за допомогою маркування кінцевою дезоксинуклеотид-трансферазою dUTP (TUNEL), опосередковані — одноклітинний гель-електрофорез (Comet), а також SCD-тест на дисперсію хроматину сперматозоїдів. Прямі методи дослідження передбачають зв'язування флуоресцентного зонда безпосередньо з сайтом розриву дволанцюгової ДНК, тоді як опосередковані методи основані на визначенні здатності хроматину до дисперсії після деструкції протамінів. Нижче наведено короткий опис перелічених методів.

Метод SCSA засновано на різній чутливості інтактною та фрагментованою ДНК до кислотної денатурації. Після забарвлення метахроматичним флуорохромом акридиновим помаранчевим реєструється флуоресценція у зеленій частині спектра у випадку інтактною дволанцюговою ДНК, або у червоній — у випадку пошкодження одного з ланцюгів ДНК. Метод TUNEL кількісно визначає включення термінальної флуоресцентної дезоксинуклеотидилтрансферазної dUTP-мітки (TUNEL) до одно- та дволанцюгових розривів ДНК шляхом мічення 3'-ОН-кінця TdT.

Методом TdT опосередкованою мітки dUTP-кінця розриву ланцюга ДНК вимірюється ступінь ушкодження ДНК шляхом вбудовування ДНК-

(bull, boar, guinea pig, rabbit, ram, stallion) and poultry (duck) [44, 45]. The gamete viability and motility are the main criteria in successful artificial insemination when using the cryopreserved sperm of animals [43]. However, it is the DNA molecule integrity that plays a decisive role in realizing such reproductive technologies as artificial insemination, *in vitro* fertilization (IVF) and intracytoplasmic sperm injection into the oocyte (ICSI), since the relationship between the sperm DNA fragmentation rate and embryo development *in vitro* has been proven [63]. In this regard, the quality of cryopreserved sperm should be assessed basing on the DNA fragmentation rate detection.

We here aimed to systematize the findings of cryopreservation impact on sperm DNA state in domestic animals and to detect the main factors affecting the DNA fragmentation and its integrity.

Research methods of sperm DNA fragmentation. Among the most common ways to test DNA fragmentation rate, the commonly distinguished ones are as follows: direct – sperm chromatin structure assay (SCSA), terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP nick end labelling (TUNEL) assay; indirect – single-cell gel electrophoresis (COMET assay), as well as sperm chromatin dispersion test (SCD). Direct research methods involve the binding of a fluorescent probe right to the double-stranded DNA break site, while the indirect ones are based on detecting the chromatin ability to disperse after protamine destruction. The listed methods are briefly described below.

The SCSA method is based on a different sensitivity of intact and fragmented DNA to acid denaturation. After staining with metachromatic fluorochrome acridine orange, a fluorescence in green region of spectrum is recorded in case of the intact double-stranded DNA, or in the red one when one of the DNA chains is damaged. The TUNEL method quantifies the incorporation of the terminal fluorescent deoxynucleotidyl transferase dUTP label (TUNEL) into the single- and double-stranded DNA breaks by labelling the 3'-OH terminus with TdT.

The TdT-mediated dUTP nick end labelling assay of DNA strand break measures the degree of DNA damage by embedding a DNA probe (modified nucleotide) at the DNA damage site.

The SCD test is based on chromatin ability to disperse around the nucleus, allowing to detect the spermatozoa with different DNA fragmentation rate.

The Comet assay is based on gel electrophoresis of individual cells and registration of their motility



зонда (модифікованого нуклеотида) у місце пошкодження ДНК.

Метод SCD ґрунтується на здатності хроматину до дисперсії навколо ядра, за рахунок чого можна розрізнити сперматозоїди з різним рівнем фрагментації ДНК.

Метод Comet базується на гель-електрофорезі окремих клітин і реєстрації їхньої рухливості у постійному електричному полі пошкодженої ДНК та/або фрагментів ДНК індивідуальних лізованих клітин, занурених у тонкий агарозний гель на стандартному предметному склі. При цьому ДНК клітини мігрує, формуючи електрофоретичний слід, що нагадує «хвіст комети», довжина якого залежить від схильності ДНК до денатурації. Рівень фрагментації ДНК в окремому сперматозоїді оцінюють за часткою ДНК у «хвості комети», а саме: за довжиною «хвоста» та інтенсивністю його забарвлення.

Ефективність описаних методів доведена багатьма дослідженнями. Так, результати SCSA показали кореляційний зв'язок між рівнем фрагментації ДНК, рухливістю та морфологічними характеристиками сперматозоїдів бика [55]. За допомогою даного методу було встановлено порогові значення рівня фрагментації ДНК сперматозоїдів сільськогосподарських тварин, за яких виявлено згубний вплив на фертильність: свиней — 6%; биків — 10–20%; коней — ~28% [13]. Цілісність ДНК заморожено-відігрітих котячих сперматозоїдів, виділених із різних відділів епідидимісу, оцінювали методами SCSA та SCD. Лише SCD-тест виявив значуще вищий рівень фрагментації ДНК сперматозоїдів, отриманих із тіла придатка яєчка тварин, порівняно з клітинами, вилученими з хвостової частини органа ($p < 0,05$). Відмінності даного показника в різних відділах придатків яєчка можуть вказувати на те, що сперматозоїди знаходяться на різних стадіях дозрівання та відрізняються ступенем конденсації хроматину, що впливає на результативність дисперсії хроматину після застосування SCD-тесту [30].

Застосування SCSA та SCD для визначення пошкодження цілісності ДНК сперматозоїдів собак також виявилось ефективним, при цьому зазначалося, що дані методи оцінюють різні пошкодження ДНК [42].

Метод TUNEL є більш чутливим для оцінки рівня фрагментації ДНК сперматозоїдів бика, оскільки допомагає встановити більше пошкоджень, ніж SCSA за забарвленням акридин помаранчевим [36], однак для SCD характерна менша відтворюваність результатів порівняно з SCSA [37]. Для визначення кількості клітин із цілісною ДНК сперматозоїдів жеребців успішно застосо-

in a constant electric field of damaged DNA and/or DNA fragments of individual lysed cells immersed in a thin agarose gel on a standard glass slide. Herewith, the cell DNA migrates, by forming an electrophoretic trace that visually resembles a 'comet's tail', the length of which depends on the DNA's tendency to denaturation. The DNA fragmentation rate in an individual spermatozoon is assessed by DNA proportion in the 'comet tail', *i. e.* by the 'tail' length and its colour intensity.

The efficiency of the described techniques was confirmed by numerous studies. For example, the SCSA results showed a correlation between the DNA fragmentation rate, motility and morphology in bovine sperm [55]. Using this method, there were established the threshold values of sperm DNA fragmentation rate in farm animals, at which a detrimental effect on fertility was revealed, namely 6% for pigs; 10–20% for bulls and 28% for horses [13]. DNA integrity of frozen-thawed cat spermatozoa, isolated from different parts of the epididymis was evaluated using SCSA and SCD tests. Only the SCD test revealed a significantly higher DNA fragmentation rate in epididymal sperm from corpus region as compared with cauda spermatozoa ($p < 0.05$). The discrepancy of this index between epididymal regions may indicate different maturation stages of spermatozoa and distinct level of chromatin condensation, which affects the efficiency of chromatin dispersion after SCD test application [30].

The SCSA and SCD tests were found to be efficient methods in detecting a damaged DNA integrity in canine sperm, and they were reported to assess different damages to DNA [42].

The TUNEL assay is more sensitive to evaluate the DNA fragmentation rate in bovine spermatozoa, because it helps to detect more damages than SCSA test by acridine orange staining [36], however, SCD test exhibits lower reproducibility than SCSA [37]. To determine the cell number with integral DNA in stallion sperm, the neutral Comet and SCSA assays are successfully used [56]. Comparing the results of SCSA and TUNEL tests showed the advantages of the first method, since in this case the dye molecules were much smaller in size, and binding to DNA in densely packed chromatin occurred more efficiently, unlike the larger TdT enzyme (TUNEL method) [13].

The DNA fragmentation rate can also be identified by quite a simple method of toluidine blue staining using light microscopy, but an intermediate staining extends the operator variability. The findings obtained using this technique correlate with the data of other classical methods for assessing



вуються методи нейтрального Comet та SCSA [56]. Порівняння результатів SCSA та TUNEL показали переваги першого методу, оскільки у цьому випадку молекули барвника значно менші за розміром, і зв'язування з ДНК у щільно упакованому хроматині відбувається ефективніше на відміну від більшого за розміром TdT ферменту (метод TUNEL) [13].

Рівень фрагментації ДНК також можна виявити досить простим у виконанні методом забарвленням толуїдиновим синім із використанням світлової мікроскопії, проте проміжне забарвлення поширює варіативність оцінки операторів. Отримані за цим методом результати корелюють з даними інших класичних методів визначення рівня цілісності ДНК [57] та характеризуються відтворюваністю відносно гамет собак, биків, жеребців, котів та баранів [48].

Таким чином, наразі існує багато методів визначення цілісності ДНК сперматозоїдів, які є важливими для діагностики репродуктивного потенціалу тварин і резистентності статевих клітин після впливу кріоконсервування, однак у деяких випадках вибір певного методу залежить від видоспецифічності організації компактизації хроматину та ступеня зрілості клітин.

Рівень фрагментації ДНК кріоконсервованих сперматозоїдів свійських тварин. Рівень фрагментації ДНК сперматозоїдів має прогностичне значення для визначення ефективності застосованого методу кріоконсервування. На гаметах барана показано кореляцію між станом ДНК сперматозоїдів та їхньою рухливістю, цілісністю акросомальної зони, рівнем мембранного мітохондріального потенціалу [18]. Після інкубації кріоконсервованих сперматозоїдів барана протягом 6 годин підвищувався рівень фрагментації їхньої ДНК. При цьому вимірюваний показник залежав від концентрації клітин у зразку: при 6×10^6 кл/мл — 30%, а при 100×10^6 кл/мл — 60% [34]. Перші 6 годин інкубації виявилися критичними для збереження цілісності ДНК сперматозоїдів, оскільки саме в цей проміжок часу відбуваються найбільші її пошкодження, а у клітинах деяких видів тварин вони досягають 50% [33].

Встановлено видоспецифічність впливу кріоконсервування на цілісність ДНК сперматозоїдів, навіть у близьких видів тварин. Так, результати визначення рівня фрагментації ДНК за SCD-тестом показали, що досліджуваний показник кріоконсервованих сперматозоїдів віслюків був на 20% нижче, ніж у жеребців. Оцінка стану генетичного апарату сперматозоїдів коней і віслюків за SCD-тестом виявила різну організацію їх-

DNA integrity [57] and show the reproducibility for dog, bull, stallion, cat and ram gametes [48].

Thus, there are currently several techniques to assess the sperm DNA integrity, which are important to assess the reproductive potential of animals and reproductive cell resistance after exposure to cryopreservation, but in some cases the choice of a certain way depends on the species-specificity of organization of chromatin compaction and maturity degree of cells.

Cryopreserved sperm DNA fragmentation rate in domestic animals. The sperm DNA fragmentation rate has a prognostic value to assess the efficiency of the applied cryopreservation technique. A correlation between the sperm DNA state and its motility, integrity of acrosomal zone, and the level of membrane mitochondrial potential has been shown in ram gametes [18]. After incubating the cryopreserved ram spermatozoa for 6 hrs, their DNA fragmentation rate was increased. At the same time, the measured index depended on cell concentration in the sample, *i. e.* it made 30% at 6×10^6 cells/ml, and 60% at 100×10^6 cells/ml [34]. The first 6 hrs of incubation occurred to be critical to maintain the sperm DNA integrity, since during this time period the highest damage occurred, and in cells of certain animal species it reached 50% [33].

The species-specific effect of cryopreservation on sperm DNA integrity has been established even in related animal species. For example, the results of determining the DNA fragmentation rate using SCD test showed the studied index of cryopreserved spermatozoa in donkeys to be 20% lower than in stallions. Evaluation of genetic apparatus state in horse and donkey spermatozoa using the SCD test revealed a different organization of their chromatin [12], which might be considered as the cause of species-specific cryoresistance of animal gametes.

A comparative analysis of DNA fragmentation rate in cryopreserved bovine spermatozoa showed this index as not significantly different in the representatives of different breeds, in contrast to the morphology, motility and gamete viability [41]. Of interest is the fact that the seasonal changes also do not disrupt the DNA integrity in bull sperm, which may indicate the stability of genetic apparatus of these species representatives [50].

Study of DNA fragmentation rate of epididymal canine spermatozoa showed no negative impact of cryopreservation, however its damaging effect on cell acrosome motility and integrity has been revealed [61]. Such DNA resistance may be due to the lack of protamine 2 in the head of



нього хроматину [12], що можна вважати причиною видоспецифічної кріорезистентності гамет тварин.

Порівняльний аналіз рівня фрагментації ДНК кріоконсервованих сперматозоїдів биків показав, що цей показник суттєво не відрізняється у представників різних порід, на відміну від морфологічних характеристик, рухливості та життєздатності гамет [41]. Цікаво, що сезонні зміни також не призводять до порушення цілісності ДНК сперматозоїдів биків, що може вказувати на стабільність генетичного апарату представників даного виду [50].

Дослідження рівня фрагментації ДНК епідидимальних сперматозоїдів собак показало відсутність негативного впливу кріоконсервування, однак при цьому було виявлено його пошкоджувальну дію на рухливість і цілісність акросоми клітин [61]. Така стійкість ДНК може бути зумовлена нестачею протаміну 2 у голівці сперматозоїдів собак [35]. Показано кореляційний зв'язок між наявністю протамінів 1 і 2 у голівці сперматозоїдів та статусом ДНК після розморожування. Сперматозоїди окремих видів тварин (морська свинка, собака, бик), які вміщують тільки протамін 1, характеризуються більшою кріорезистентністю відносно фрагментації ДНК, ніж види з наявністю обох протамінів (гризуни) [32]. Сперматозоїди, які містять лише протамін 1, демонструють меншу конденсацію ДНК та більш міцні протамінно-протамінові зв'язки, що пояснює стабільність молекули [47]. Однак попри те, що сперматозоїди свиней містять тільки протамін 1, вони характеризуються низькою кріорезистентністю [17]. Порівняно з іншими видами (віслюк, кінь) сперматозоїди свиней містять найбільшу кількість залишків цистеїну, які повинні забезпечити стабільність молекули ДНК у конденсованому хроматині [19]. Зазначається, що бичачий протамін 1 має менше залишків цистеїну, ніж його аналог у сперматозоїдах свиней, що призводить до меншого ступеню деконденсації ДНК. Однак, ймовірно, саме така відмінність структури ДНК свиней робить хроматин сперматозоїдів більш вразливим до пошкоджень під час кріоконсервування. При цьому може змінюватись не тільки протамін 1, але й структура ядра сперматозоїдів свині в цілому, яке має особливу видоспецифічну будову [15]. Показано, що ядра сперматозоїдів свині та бика мають дископодібну структуру, тоді як сперматозоїди коня — овальну [21].

Як зазначалося вище, конденсація хроматину значно впливає на стабільність структури ДНК і визначає кріорезистентність сперматозоїдів [47]. Щільна упаковка молекули ДНК відбувається

dog spermatozoa [35]. A correlation between the presence of protamines 1 and 2 in the head of spermatozoa and the DNA status after thawing was shown. Spermatozoa of certain animal species (guinea pig, dog, bull), containing protamine 1 only, are characterized by higher cryoresistance to DNA fragmentation than the species with both protamines presented (rodents) [32]. Spermatozoa, containing the protamine 1 only show a lower DNA condensation and stronger protamine-protamine bonds, which explains the molecule stability [47]. However, despite the fact that boar spermatozoa comprise the protamine 1 only, they are characterized with low cryoresistance [17]. Compared to other species (donkey, horse), the boar spermatozoa contain the highest number of cysteine residues, which should ensure the stability of DNA molecule in a condensed chromatin [19]. Bovine protamine 1 is reported to have fewer cysteine residues than its analogue in boar spermatozoa, that causes lower DNA decondensation. However, that is the difference in boar DNA structure that likely makes the sperm chromatin more vulnerable to damage during cryopreservation. At the same time, not only the protamine 1 can be altered, but the overall nuclear structure of boar sperm as well, which has a particular species-specific structure [15]. It has been shown that the nuclei of boar and bull spermatozoa have a disk-like structure, while those of horse are oval [21].

As mentioned above, the chromatin condensation significantly affects the stability of DNA structure and determines the spermatozoa cryoresistance [47]. Dense packaging of DNA molecule occurs as a result of the replacement of histones with protamines at the terminal stages of spermatogenesis in caudal epididymis [5]. This fact explains the higher level of DNA damage in cryopreserved feline testicular spermatozoa, where the chromatin is less condensed if compared with ejaculatory and caudal epididymal spermatozoa [10].

An increased rate of DNA fragmentation may result from deprotamination caused by cryopreservation. This effect was shown in goat spermatozoa [28].

In addition, the impact of age-related changes on increased cell sensitivity to cryodamage, entailing the rise of DNA fragmentation rate, was revealed in dog spermatozoa [8].

Thus, the cryoresistance of sperm genetic apparatus is determined by many factors such as: a species-specific organization of chromatin compaction, individual initial characteristics of DNA integrity, and age-related changes.



в результаті заміни гістонів на протаміни на термінальних стадіях сперматогенезу у хвостовій частині епідидимусу [5]. Даний факт пояснює більш високий рівень пошкодження ДНК кріоконсервованих тестикулярних котячих сперматозоїдів, у яких хроматин менш конденсований порівняно з еякуляторними сперматозоїдами та сперматозоїдами вихідного відділу епідидимусу [10].

Підвищення рівня фрагментації ДНК може відбуватися в результаті депротамінації, спричиненої кріоконсервуванням. Даний ефект було показано на сперматозоїдах цапів [28].

Крім того, на сперматозоїдах собак було продемонстровано вплив вікових змін на підвищення чутливості клітин до кріопошкоджень, внаслідок яких збільшується рівень фрагментації ДНК [8].

Таким чином, кріостійкість генетичного апарату сперматозоїдів визначається багатьма чинниками, а саме: видоспецифічністю організації компактизації хроматину, індивідуальними вихідними характеристиками цілісності ДНК та віковими змінами.

Причини пошкодження ДНК у кріоконсервованих сперматозоїдів. На сьогодні існує кілька гіпотез пояснення причини пошкодження ДНК: неправильна упаковка ДНК та конденсація хроматину під час дозрівання сперматозоїдів [3, 38], оксидативний стрес [53] та апоптоз [40, 51].

Слід зазначити, що активні форми кисню (АФК) відіграють важливу фізіологічну роль у функціонуванні сперматозоїдів [22]. У яечках АФК є незамінними складовими процесу проліферації та дозрівання чоловічих статевих клітин у ході мейозу — від диплоїдної сперматогонії до зрілих гаплоїдних сперматозоїдів [58]. АФК (супероксидний аніон, перекис водню та оксид азоту) індукують гіперактивацію сперматозоїдів, капітацію або акросомальну реакцію та впливають на запліднення [24, 31]. Однак надмірне утворення АФК викликає пошкодження ліпідів та ДНК. Це призводить до зміни властивості мембрани, зменшення мітохондріального потенціалу та пошкодження структури ДНК, що врешті-решт знижує функціональні показники сперматозоїдів і викликає безпліддя. Вважається, що джерелом АФК у суспензіях сперматозоїдів є розташована в лейкоцитах NADPH оксидаза, яка виробляє супероксид, який додатково перетворюється на перексид [20]. Регулювання рівня АФК відбувається антиоксидантною системою, водночас активність якої залежить від кількості вільних радикалів [7]. Вплив кріоконсервування сперматозоїдів на підвищення рівня оксидативного стресу було показано J. Totic та співавт. [59]. Додавання екстендера, що містив

Causes of DNA damage in cryopreserved spermatozoa. To date, there are several hypotheses to explain the cause of DNA damage, namely the DNA mispackaging and chromatin condensation during sperm maturation [2, 38], oxidative stress [53] and apoptosis [40, 51].

It should be noted that the reactive oxygen species (ROS) play an important physiological role in sperm function [22]. In testis, ROS are indispensable in proliferation and maturation of male germ cells during meiosis: from diploid spermatogonia to mature haploid spermatozoa [58]. The ROS (superoxide anion, hydrogen peroxide, and nitric oxide) induce sperm hyperactivation, capacitation or acrosome reaction and affect the fertilization [24, 31].

However, an excessive ROS production induces the damage to lipids and DNA. This entails a change in membrane properties, decreases a mitochondrial potential and damages the DNA structure, which ultimately reduces sperm functional indices and causes infertility. The NADPH oxidase located in leukocytes which produces superoxide, which is further converted into peroxide is believed to be the ROS source in sperm suspensions [20]. The ROS level is regulated by antioxidant system, the activity of which depends on the amount of free radicals [6]. The impact of sperm cryopreservation on an increased level of oxidative stress was reported by J. Totic *et al.* [59]. The cattle spermatozoa supplement with egg yolk-contained extender caused a loss of their motility. Due to the presence of aromatic amino acids in egg yolk, the level of hydrogen peroxide, produced by amino acid oxidase was elevated. Experiments with bovine sperm cryopreservation showed the relationships between the risen DNA fragmentation and increased synthesis of H₂O₂ [23]. Despite the fact that many factors (cold shock, osmotic pressure, intracellular ice crystal formation) affect mammalian sperm during cryopreservation, an oxidative stress is the most detrimental, and leads to damage in DNA integrity.

Methods for improving the cryopreserved sperm DNA integrity in animals. As mentioned above, the oxidative stress is the main factor of DNA fragmentation increase during sperm cryopreservation. Therefore, for its prevention/reduction, the antioxidants, *i. e.* compounds destroying oxidative chain reaction are introduced into cryoprotective or rehabilitation media [29]. Superoxide dismutase, catalase, glutathione peroxidase, and glutathione reductase can be referred to enzymatic antioxidants that neutralize excess ROS and prevent damage to cellular structure. Superoxide dismutase (SOD)



ячний жовток, до сперматозоїдів великої рогатої худоби викликало втрату їхньої рухливості. Через наявність ароматичних амінокислот яєчного жовтка підвищується рівень перекису водню, що виробляється амінокислотою оксидазою. В експериментах з кріоконсервування сперматозоїдів бика було показано, що підвищення рівня фрагментації ДНК пов'язане зі збільшенням синтезу H_2O_2 [23]. Незважаючи на те, що на пошкодження сперматозоїдів ссавців у процесі кріоконсервування впливає багато факторів (холодовий шок, осмотичний тиск, утворення внутрішньоклітинних кристалів льоду), найбільший негативний ефект має оксидативний стрес, який призводить до порушення цілісності ДНК.

Методи підвищення цілісності ДНК кріоконсервованих сперматозоїдів тварин. Як зазначалося вище, основним чинником підвищення рівня фрагментації ДНК під час кріоконсервування сперматозоїдів є оксидативний стрес. Тому для його запобігання/зниження до складу кріозахисного або реабілітаційного середовища додають антиоксиданти — сполуки, які руйнують окислювальну ланцюгову реакцію [29]. До ферментних антиоксидантів, що нейтралізують надлишок АФК і запобігають пошкодженню клітинної структури, можна віднести супероксиддисмутазу, каталазу, глутатіонпероксидазу та глутатіонредуктазу. Супероксиддисмутаза (СОД) спонтанно перетворює супероксид-аніон (O^{2-}) на O_2 та H_2O_2 , тоді як каталаза — H_2O_2 на O_2 та H_2O . Таким чином, СОД та каталаза знешкоджують руйнівну дію іонів O^{2-} , що утворюються оксидазою НАДФН (нікотінамідаденіндинуклеотидфосфат відновлений) у нейтрофілах, підвищує пероксидне окислення ліпідів та порушує цілісність ДНК [62]. Показано, що після додавання аналога СОД до середовища кріоконсервування сперматозоїдів альпаки збільшувалась кількість рухливих клітин та знижувався рівень фрагментації ДНК [54]. Аналогічний ефект було продемонстровано на кріоконсервованих сперматозоїдах цапів, при цьому спостерігали прискорення акросомальної реакції та покращення розвитку ембріонів після запліднення ооцитів [16]. Запліднювальна здатність сперматозоїдів биків також підвищувалась після застосування СОД у складі кріозахисного середовища [4]. Додавання каталази до середовища реабілітації кріоконсервованих сперматозоїдів бика сприяло збереженню значуще більшої кількості клітин з неушкодженою ДНК [14].

Серед неферментних антиоксидантів, відомих як синтетичні антиоксиданти або харчові домішки, можна виділити вітаміни та мінерали (вітамі-

spontaneously converts superoxide anion (O^{2-}) to O_2 and H_2O_2 , while catalase does H_2O_2 to O_2 and H_2O . Thus, SOD and catalase neutralize the destructive effect of O^{2-} ions produced by NADPH (reduced nicotinamide adenine dinucleotide phosphate) oxidase in neutrophils, increase lipid peroxidation and disrupt DNA integrity [62]. It was shown that after supplementing the alpaca sperm cryopreservation medium with a SOD analogue, the number of motile cells increased and DNA fragmentation rate decreased [54]. Cryopreserved goat spermatozoa exhibited a similar effect; herewith an accelerated acrosomal reaction and improvement of embryo development after oocyte fertilization were observed [16]. The fertilizing ability of bovine spermatozoa was also improved after using SOD within a cryoprotective medium [3]. Supplementing the rehabilitation medium of cryopreserved bovine spermatozoa with catalase ensured the survival of a much higher number of cells with undamaged DNA [14].

Among the non-enzymatic antioxidants, known as synthetic antioxidants or food additives, we can emphasize vitamins and minerals (vitamins C and E, zinc, taurine, hypotaurine and glutathione) [2]. Vitamin E can directly neutralize free radicals during iron ascorbate-induced LPO, making it a major antioxidant. In addition, vitamin E improves sperm motility both under oxidative stress presence and absence. Enrichment of incubation medium with vitamin E increases sperm motility [5]. Cysteine has a protective effect on functional integrity of acrosome and mitochondria in bull, ram, and goat spermatozoa, manifested in enhanced motility of cells [60].

As mentioned above, the extenders used for mammalian sperm freezing, are supplemented with the substances of animal origin, such as egg yolk and/or milk. Egg yolk low-density lipoproteins protect spermatozoa from damage during cooling, freezing, and storage [46]. S. Chelucci *et al.* [11] have assessed the impact of different concentrations of soybean lecithin on characteristics of cryopreserved goat spermatozoa. The number of spermatozoa with intact acrosomes did not differ in native specimens and those cryopreserved with soybean lecithin.

A new step in overcoming the negative consequences of oxidative stress in cryopreserved spermatozoa was to combine antioxidants with nanoparticles, liposomes and exosomes in protective media [49]. A positive effect of selenium nanoparticles on progressive motility, viability and membrane integrity of post-thaw spermatozoa was proven, herewith the percentage of early apoptotic, apop-

ни С та Е, цинк, таурин, гіпотаурин і глутатіон) [3]. Вітамін Е безпосередньо може знешкодити вільні радикали під час ПОЛ, викликаного аскорбатом заліза, завдяки такій здатності він вважається основним антиоксидантом. Крім того, вітамін Е покращує рухливість сперматозоїдів як за умов оксидативного стресу, так і за його відсутності. Збагачення інкубаційного середовища вітаміном Е збільшує рухливість сперматозоїдів [6]. Цистеїн має захисну дію на функціональну цілісність акросоми та мітохондрій сперматозоїдів бика, барана і козла, що виявляється в посиленні моторики клітин [60].

Вище зазначалося, що до складу екстендерів, які використовують для заморожування сперматозоїдів ссавців, додають такі речовини тваринного походження, як яєчний жовток та/або молоко. Ліпопротеїни низької щільності яєчного жовтка захищають сперматозоїди від пошкодження під час охолодження, заморожування та зберігання [46]. S. Chelucci та співавт. [11] оцінили вплив різних концентрацій соєвого лецитину на морфологічні характеристики кріоконсервованих сперматозоїдів козла. Кількість сперматозоїдів з інтактними акросомами не відрізнялася у нативних та кріоконсервованих із соєвим лецитином зразках.

Новим етапом у подоланні негативних наслідків оксидативного стресу в кріоконсервованих сперматозоїдах було поєднання в захисних середовищах антиоксидантів із наночастинками, ліпосомами та екзосомами [49]. Доведено, що наночастинки Se позитивно впливали на прогресивну рухливість, життєздатність та цілісність мембрани сперматозоїдів після розморожування, при цьому відсоток ранніх апоптотичних, апоптотичних і некротичних клітин зменшився. Показано, що після додавання до складу кріозахисного середовища наночастинок Se фертильність биків підвищувалась (90%) порівняно з контролем (59%) [26].

A. Mokarizadeh та співавт. [39] повідомили, що антиоксидантна активність кріоконсервованих сперматозоїдів щурів підвищувалась після їх обробки екзосомами перед кріоконсервуванням.

Наночастинки екстрактів м'яти, чебрецю та куркуміну, які додавали до складу середовища кріоконсервування, зменшували кількість апоптотичних клітин, викликали деконденсацію хроматину, збільшували загальну антиоксидантну та каталазну активність сперматозоїдів цапів [25]. Додавання наночастинок куркуміну до екстендеру сперматозоїдів кролів позитивно впливало на їх прогресивну рухливість, життєздатність та цілісність мембран [2].

apoptotic, and necrotic cells decreased. After supplementing the cryoprotective medium with selenium nanoparticles, the bovine fertility was improved (90%) compared to the control (59%) [26].

A.A. Mokarizadeh *et al.* [39] reported an increase in antioxidant activity of cryopreserved rat spermatozoa after treatment with exosomes prior to cryopreservation.

Nanoparticles of mint, thyme, and curcumin extracts added to cryopreservation medium reduced the number of apoptotic cells, caused chromatin decondensation, and elevated the total antioxidant and catalase activity in goat spermatozoa [25]. Supplementation of curcumin nanoparticles to extender of rabbit spermatozoa had a positive impact on their progressive motility, viability and membrane integrity [1].

So, nowadays the assisted reproductive technologies in animal husbandry involves different techniques, which augment the DNA stability. However, a special structure of gamete in different animals requires finding the species-specific methods to protect the cryopreserved sperm DNA integrity in domestic animals and designing the approaches to reduce the DNA fragmentation.

Conclusions

1. Species specificity of nuclear chromatin compaction and nuclear structure plays an important role in sperm genetic material resistance due to a damaging effect of cryopreservation factors, therefore it should be taken into account when selecting a method to assess the DNA fragmentation.

2. Oxidative stress caused by increased content of reactive oxygen species was recognized as the main mechanism of cryodamage to DNA integrity. In this regard, the application of antioxidants (non-enzymatic, enzymatic compounds and nanoparticles) within the protective and rehabilitation solutions prior to and after cryopreservation is expedient.

This research was implemented with the support of the National Academy of Sciences of Ukraine within the priority topic 2.2.6.130 'Impact of cryopreservation on DNA fragmentation state in spermatogenic cells at different stages of differentiation'.

References

1. Abdelnour SA, Hassan MAE, Mohammed AK, et al. The effect of adding different levels of curcumin and its nanoparticles to extender on post-thaw quality of cryopreserved rabbit sperm.



Отже, сьогодні при застосуванні допоміжних репродуктивних технологій у тваринництві використовують різні методи, які підвищують стабільність ДНК. Однак особливість будови гамет різних тварин потребує пошуку видоспецифічних методів захисту цілісності ДНК кріоконсервованих сперматозоїдів свійських тварин та розроблення підходів до зниження рівня фрагментації ДНК.

Висновки

1. Видоспецифічність компактизації ядерного хроматину та структури ядра відіграє важливу роль у резистентності генетичного матеріалу сперматозоїдів внаслідок пошкоджувальної дії факторів кріоконсервування, тому її слід враховувати під час вибору методу для оцінювання рівня фрагментації ДНК.

2. Основним механізмом кріопшкоджень цілісності ДНК визнано оксидативний стрес, спричинений підвищеним вмістом активних форм кисню. У зв'язку з цим доцільним є застосування у складі захисних та реабілітаційних розчинів антиоксидантів (неферментні, ферментні сполуки та наночастинки) до та після кріоконсервування.

Робота виконана за підтримки Національної академії наук України в рамках пріоритетної тематики 2.2.6.130 «Вплив кріоконсервування на стан фрагментації ДНК сперматогенних клітин різних стадій диференціювання».

Література

1. Бернштейн АД, Петропавловский ВВ. Влияние незлектролитов на продвижение сперматозоидов. Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. 1937; 3 (1): 41-3.
2. Abdelnour SA, Hassan MAE, Mohammed AK, et al. The effect of adding different levels of curcumin and its nanoparticles to extender on post-thaw quality of cryopreserved rabbit sperm. *Animals*. [Internet] 2020 Aug 26 [cited 2021 Sep 21]; 10(9):1508. Available from: <https://www.mdpi.com/2076-2615/10/9/1508/htm>
3. Agarwal A, Gupta S, Sharma RK. Role of oxidative stress in female reproduction. *Reprod Biol Endocrinol*. [Internet] 2005 Jul 14 [cited 2021 Aug 21]; 3:28. Available from: <https://rbej.biomedcentral.com/articles/10.1186/1477-7827-3-28>
4. Ahmad Z, Ali L, Ahmed H, et al. Superoxide dismutase in extender improves the in vitro quality and in vivo fertility of cryopreserved water buffalo (*Bubalus bubalis*) spermatozoa. *Cryoletters*. 2020; 41(4): 194–201.
5. Ali Hassan H, Domain G, Luvoni GC, et al. Canine and feline epididymal semen-A plentiful source of gametes. *Animals*. [Internet] 2021 Oct 14 [cited 2021 Sep 21]; 11(10): 2961. Available from: <https://www.mdpi.com/2076-2615/11/10/2961>
6. Bansal AK, Bilaspuri GS. Antioxidant effect of vitamin E on motility, viability and lipid peroxidation of cattle spermatozoa

- Animals*. [Internet] 2020 Aug 26 [cited 2021 Sep 21]; 10(9):1508. Available from: <https://www.mdpi.com/2076-2615/10/9/1508/htm>
2. Agarwal A, Gupta S, Sharma RK. Role of oxidative stress in female reproduction. *Reprod Biol Endocrinol*. [Internet] 2005 Jul 14 [cited 2021 Aug 21]; 3:28. Available from: <https://rbej.biomedcentral.com/articles/10.1186/1477-7827-3-28>
3. Ahmad Z, Ali L, Ahmed H, et al. Superoxide dismutase in extender improves the in vitro quality and in vivo fertility of cryopreserved water buffalo (*Bubalus bubalis*) spermatozoa. *Cryoletters*. 2020; 41(4): 194–201.
4. Ali Hassan H, Domain G, Luvoni GC, et al. Canine and feline epididymal semen-A plentiful source of gametes. *Animals*. [Internet] 2021 Oct 14 [cited 2021 Sep 21]; 11(10): 2961. Available from: <https://www.mdpi.com/2076-2615/11/10/2961>
5. Bansal AK, Bilaspuri GS. Antioxidant effect of vitamin E on motility, viability and lipid peroxidation of cattle spermatozoa under oxidative stress. *Anim Sci Pap Rep*. 2009; 27(1): 5–14.
6. Bansal AK, Bilaspuri GS. Impacts of oxidative stress and antioxidants on semen functions. *Vet Med Int* [Internet] 2010 Sep 07 [cited 2021 Sep 11] 2011:686137. Available from: <https://www.hindawi.com/journals/vmi/2011/686137/>
7. Bernstein AD, Petropavlovsky VV. [Effect of non-electrolytes on viability of spermatozoa]. *Byull Eksp Biol Med*. 1937; 3: 41–3. Russian.
8. Brito MM, Angrimani DSR, Rui BR, et al. Effect of senescence on morphological, functional and oxidative features of fresh and cryopreserved canine sperm. *Aging Male*. 2020; 23(4): 279–86.
9. Capanna E. Lazzaro Spallanzani: At the roots of modern biology. *J Exp Zool*. 1999; 85: 178–96.
10. Chatdarong K. Retained fertilizing capability in cryopreserved feline spermatozoa. *Reprod Domest Anim*. 2017; 52(2): 261–4.
11. Chelucci S, Pasciu V, Succu S, et al. Soybean lecithin-based extender preserves spermatozoa membrane integrity and fertilizing potential during goat semen cryopreservation. *Theriogenology*. 2015; 83(6): 1064–74.
12. Cortés-Gutiérrez EI, Crespo F, Serres-Dalmau C, et al. Assessment of sperm DNA fragmentation in stallion (*Equus caballus*) and donkey (*Equus asinus*) using the sperm chromatin dispersion test. *Reprod Domest Anim*. 2009; 44(5): 823–8.
13. Evenson DP. The Sperm Chromatin Structure Assay (SCSA) and other sperm DNA fragmentation tests for evaluation of sperm nuclear DNA integrity as related to fertility. *Anim Reprod Sci*. 2016; 169: 56–75.
14. Fernández-Santos MR, Domínguez-Rebolledo AE, Estes MC, et al. Catalase supplementation on thawed bull spermatozoa abolishes the detrimental effect of oxidative stress on motility and DNA integrity. *Int J Andr*. 2009; 32(4): 353–9.
15. Flores E, Cifuentes D, Fernández-Novell JM, et al. Freezing-thawing induces alterations in the protamine-1/DNA overall structure in boar sperm. *Theriogenology*. 2008; 69(9): 1083–94.
16. Forouzanfar M, Abid A, Hosseini SM, et al. Supplementation of sperm cryopreservation media with cell permeable superoxide dismutase mimetic agent (MnTE) improves goat blastocyst formation. *Cryobiology*. 2013; 67(3): 394–7.
17. Fraser L, Strzezek J. Is there a relationship between the chromatin status and DNA fragmentation of boar spermatozoa following freezing-thawing? *Theriogenology*. 2007; 68(2): 248–57.
18. Galarza DA, López-Sebastián A, Woelders H, et al. Two-step accelerating freezing protocol yields a better motility, membranes and DNA integrities of thawed ram sperm than three-steps freezing protocols. *Cryobiology*. 2019; 91: 84–9.
19. Gosálvez J, López-Fernández C, Fernández JL, et al. Relationships between the dynamics of iatrogenic DNA damage and genomic design in mammalian spermatozoa from eleven species. *Mol Reprod Dev*. 2011; 78: 951–61.
20. Griveau JF, Le Lannou D. Reactive oxygen species and human spermatozoa: physiology and pathology. *Int J Androl*. 1997; 20(2): 61–9.



- under oxidative stress. *Animal Science Papers Reports*. 2009; 27(1): 5–14.
7. Bansal AK, Bilaspuri GS. Impacts of oxidative stress and antioxidants on semen functions. *Vet Med Int [Internet]* 2010 Sep 07 [cited 2021 Sep 11] 2011: 686137. Available from: <https://www.hindawi.com/journals/vmi/2011/686137/>
 8. Brito MM, Angrimani DSR, Rui BR, et al. Effect of senescence on morphological, functional and oxidative features of fresh and cryopreserved canine sperm. *Aging Male*. 2020; 23(4): 279–86.
 9. Capanna E. Lazzaro Spallanzani: At the roots of modern biology. *J Exp Zool*. 1999; 85: 178–96.
 10. Chatdarong K. Retained fertilizing capability in cryopreserved feline spermatozoa. *Reprod Domest Anim*. 2017; 52(2): 261–4.
 11. Chelucci S, Pasciu V, Succu S, et al. Soybean lecithin-based extender preserves spermatozoa membrane integrity and fertilizing potential during goat semen cryopreservation. *Theriogenology*. 2015; 83(6): 1064–74.
 12. Cortés-Gutiérrez EI, Crespo F, Serres-Dalmau C, et al. Assessment of sperm DNA fragmentation in stallion (*Equus caballus*) and donkey (*Equus asinus*) using the sperm chromatin dispersion test. *Reprod Domest Anim*. 2009; 44(5): 823–8.
 13. Evenson DP. The Sperm Chromatin Structure Assay (SCSA) and other sperm DNA fragmentation tests for evaluation of sperm nuclear DNA integrity as related to fertility. *Anim Reprod Sci*. 2016; 169: 56–75.
 14. Fernández-Santos MR, Domínguez-Rebolledo AE, Estes MC, et al. Catalase supplementation on thawed bull spermatozoa abolishes the detrimental effect of oxidative stress on motility and DNA integrity. *Int J Andr*. 2009; 32(4): 353–9.
 15. Flores E, Cifuentes D, Fernández-Novell JM, et al. Freezing-thawing induces alterations in the protamine-1/DNA overall structure in boar sperm. *Theriogenology*. 2008; 69(9): 1083–94.
 16. Forouzanfar M, Abid A, Hosseini SM, et al. Supplementation of sperm cryopreservation media with cell permeable superoxide dismutase mimetic agent (MnTE) improves goat blastocyst formation. *Cryobiology*. 2013; 67(3): 394–7.
 17. Fraser L, Strzerek J. Is there a relationship between the chromatin status and DNA fragmentation of boar spermatozoa following freezing-thawing? *Theriogenology*. 2007; 68(2): 248–57.
 18. Galarza DA, López-Sebastián A, Woelders H, et al. Two-step accelerating freezing protocol yields a better motility, membranes and DNA integrities of thawed ram sperm than three-steps freezing protocols. *Cryobiology*. 2019; 91: 84–9.
 19. Gosálvez J, López-Fernández C, Fernández JL, et al. Relationships between the dynamics of iatrogenic DNA damage and genomic design in mammalian spermatozoa from eleven species. *Mol Reprod Dev*. 2011; 78: 951–61.
 20. Griveau JF, Le Lannou D. Reactive oxygen species and human spermatozoa: physiology and pathology. *Int J Androl*. 1997; 20(2): 61–9.
 21. Gu N-H, Zhao W-L, Wang G-S, Sun F. Comparative analysis of mammalian sperm ultrastructure reveals relationships between sperm morphology, mitochondrial functions and motility. *Reprod Biol Endocrinol*. [Internet] 2019 Aug 15 [cited 2021 Apr 30]; 17: 66. Available from: <https://rbej.biomedcentral.com/articles/10.1186/s12958-019-0510-y>
 22. Guerriero G, Trocchia S, Abdel-Gawad FK, Ciarcia G. Roles of reactive oxygen species in the spermatogenesis regulation. *Front Endocrinol (Lausanne)*. [Internet] 2014 Apr 22 [cited 2021 Apr 30]; 5: 56. Available from: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fendo.2014.00056/full>
 23. Gürlér H, Malama E, Heppelmann M, et al. Effects of cryopreservation on sperm viability, synthesis of reactive oxygen species, and DNA damage of bovine sperm. *Theriogenology*. 2016; 86(2): 562–71.
 24. Homa ST, Vessey W, Perez-Miranda A, et al. Reactive oxygen species (ROS) in human semen: determination of a reference range. *J Assist Reprod Genet*. 2015; 32(5): 757–64.
 25. Ismail AA, Abdel-Khalek AE, Khalil WA, et al. Effects of mint, thyme, and curcumin extract nanoformulations on the sperm
 21. Gu N-H, Zhao W-L, Wang G-S, Sun F. Comparative analysis of mammalian sperm ultrastructure reveals relationships between sperm morphology, mitochondrial functions and motility. *Reprod Biol Endocrinol*. [Internet] 2019 Aug 15 [cited 2021 Apr 30]; 17: 66. Available from: <https://rbej.biomedcentral.com/articles/10.1186/s12958-019-0510-y>
 22. Guerriero G, Trocchia S, Abdel-Gawad FK, Ciarcia G. Roles of reactive oxygen species in the spermatogenesis regulation. *Front Endocrinol (Lausanne)*. [Internet] 2014 Apr 22 [cited 2021 Apr 30]; 5: 56. Available from: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fendo.2014.00056/full>
 23. Gürlér H, Malama E, Heppelmann M, et al. Effects of cryopreservation on sperm viability, synthesis of reactive oxygen species, and DNA damage of bovine sperm. *Theriogenology*. 2016; 86(2): 562–71.
 24. Homa ST, Vessey W, Perez-Miranda A, et al. Reactive oxygen species (ROS) in human semen: determination of a reference range. *J Assist Reprod Genet*. 2015; 32(5): 757–64.
 25. Ismail AA, Abdel-Khalek AE, Khalil WA, et al. Effects of mint, thyme, and curcumin extract nanoformulations on the sperm
 26. Khalil WA, El-Harairy MA, Zeidan AE, et al. Impact of selenium nano-particles in semen extender on bull sperm quality after cryopreservation. *Theriogenology*. 2019; 126: 121–7.
 27. Kopeika EF, Petrushko MP, Piniaviev VI, et al. Cryopreservation of reproductive cells and embryos of laboratory, agricultural and wild animals. *Probl Cryobiol Cryomed*. 2019; 29 (1): 3–18.
 28. Kritaniya D, Yadav S, Swain DK, et al. Freezing-thawing induces deprotonation, cryocapacitation-associated changes; DNA fragmentation; and reduced progesterone sensitivity in buck spermatozoa. *Anim Reprod Sci*. [Internet] 2020 Oct 16 [cited 2021 Sep 30]; 223:106628. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0378432020305005>
 29. Kumar H, Mahmood S. The use of fast acting antioxidants for the reduction of cow placental retention and subsequent endometritis. *Ind J Anim Sci*. 2001; 71(7): 650–3.
 30. Kunkitti P, Sjö Dahl A, Bergqvist AS, et al. Comparison of DNA fragmentation assay in frozen-thawed cat epididymal sperm. *Reprod Domest Anim*. 2016; 51(4): 618–22.
 31. Lamirande de E, Jiang H, Zini A, et al. Reactive oxygen species and sperm physiology. *Rev Reprod*. 1997; 2(1):48–54.
 32. Lee CH, Cho YH. Aspects of mammalian spermatogenesis: electrophoretic analysis of protamines in mammalian species. *Mol Cells*. 1999; 9(5): 556–9.
 33. López-Fernández C, Crespo F, Arroyo F, et al. Dynamics of sperm DNA fragmentation in domestic animals II. The stallion. *Theriogenology*. 2007; 68(9): 1240–50.
 34. López-Fernández C, Johnston SD, Fernández JL, et al. Fragmentation dynamics of frozen-thawed ram sperm DNA is modulated by sperm concentration. *Theriogenology*. 2010; 74(8): 1362–70.
 35. Luvoni GC, Morselli MG. Canine epididymal spermatozoa: a hidden treasure with great potential. *Reprod Dom Anim*. 2017; 52(2): 197–201.
 36. Martins CF, Dode MN, Bão SN, Rumpf R. The use of the acridine orange test and the TUNEL assay to assess the integrity of freeze-dried bovine spermatozoa DNA. *Genet Mol Res*. 2007; 6(1): 94–104.
 37. Martínez-Pastor F, Fernández-Santos MR, Domínguez-Rebolledo AE, et al. Biology of reproduction group. DNA status on thawed semen from fighting bull: a comparison between the SCD and the SCSA tests. *Reprod Dom Anim*. 2009; 44: 424–31.
 38. McPherson SM, Longo FJ. Localization of DNase I-hyper-sensitive regions during rat spermatogenesis: stage-dependent patterns and unique sensitivity of elongating spermatids. *Mol Reprod Dev*. 1992; 31(4): 268–79.



- quality, apoptosis, chromatin decondensation, enzyme activity, and oxidative status of cryopreserved goat semen. *Cryobiology*. 2020; 97: 144–52.
26. Khalil WA, El-Harairy MA, Zeidan AE, et al. Impact of selenium nano-particles in semen extender on bull sperm quality after cryopreservation. *Theriogenology*. 2019; 126: 121–7.
 27. Kopeika EF, Petrushko MP, Piniaviev VI, et al. Cryopreservation of reproductive cells and embryos of laboratory, agricultural and wild animals. *Probl Cryobiol Cryomed*. 2019; 29 (1): 3–18.
 28. Kritaniya D, Yadav S, Swain DK, et al. Freezing-thawing induces deprotamination, cryocapacitation-associated changes; DNA fragmentation; and reduced progesterone sensitivity in buck spermatozoa. *Anim Reprod Sci*. [Internet] 2020 Oct 16 [cited 2021 Sep 30]; 223: 106628. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0378432020305005>
 29. Kumar H, Mahmood S. The use of fast acting antioxidants for the reduction of cow placental retention and subsequent endometritis. *Ind J Anim Sci*. 2001; 71(7): 650–3.
 30. Kunkitti P, Sjö Dahl A, Bergqvist AS, et al. Comparison of DNA fragmentation assay in frozen-thawed cat epididymal sperm. *Reprod Domest Anim*. 2016; 51(4): 618–22.
 31. Lamirande de E, Jiang H, Zini A, et al. Reactive oxygen species and sperm physiology. *Rev Reprod*. 1997; 2(1):48–54.
 32. Lee CH, Cho YH. Aspects of mammalian spermatogenesis: electrophoretic analysis of protamines in mammalian species. *Mol Cells*. 1999; 9(5): 556–9.
 33. López-Fernández C, Crespo F, Arroyo F, et al. Dynamics of sperm DNA fragmentation in domestic animals II. The stallion. *Theriogenology*. 2007; 68(9): 1240–50.
 34. López-Fernández C, Johnston SD, Fernández JL, et al. Fragmentation dynamics of frozen-thawed ram sperm DNA is modulated by sperm concentration. *Theriogenology*. 2010; 74(8): 1362–70.
 35. Luvoni GC, Morselli MG. Canine epididymal spermatozoa: a hidden treasure with great potential. *Reprod Dom Anim*. 2017; 52(2): 197–201.
 36. Martins CF, Dode MN, Bão SN, Rumpf R. The use of the acridine orange test and the TUNEL assay to assess the integrity of freeze-dried bovine spermatozoa DNA. *Genet Mol Res*. 2007; 6(1): 94–104.
 37. Martínez-Pastor F, Del Rocío Fernández-Santos M, Domínguez-Rebolledo ÁE, et al. Biology of reproduction group. DNA status on thawed semen from fighting bull: a comparison between the SCD and the SCSA tests. *Reprod Dom Anim*. 2009; 44: 424–31.
 38. McPherson SM, Longo FJ. Localization of DNase I-hyper-sensitive regions during rat spermatogenesis: stage-dependent patterns and unique sensitivity of elongating spermatids. *Mol Reprod Dev*. 1992; 31(4): 268–79.
 39. Mokarizadeh A, Rezvanfar M-A, Dorostkar K, et al. Mesenchymal stem cell derived microvesicles: trophic shuttles for enhancement of sperm quality parameters. *Reprod Toxicol*. 2013; 42: 78–84.
 40. Moustafa MH, Sharma RK, Thornton J, et al. Relationship between ROS production, apoptosis and DNA denaturation in spermatozoa from patients examined for infertility. *Hum Reprod*. 2004; 19(1): 129–38.
 41. Ntemka A, Tsousis G, Brozos C, et al. Breed differences of bull frozen-thawed semen. *Reprod Domest Anim*. 2016; 51(6): 945–52.
 42. Ortiz I, Urbano M, Dorado J, et al. Comparison of DNA fragmentation of frozen-thawed epididymal sperm of dogs using sperm chromatin structure analysis and sperm chromatin dispersion test. *Anim Reprod Sci*. 2017; 187: 74–8.
 43. Pavlovych O, Hapon H, Yurchuk T, et al. Ultrastructural and functional characteristics of human spermatozoa after cryopreservation by vitrification. *Probl Cryobiol Cryomed*. 2020; 30(1): 24–33.
 44. Polge C, Smith AU, Parkes AS. Revival of spermatozoa after vitrification at low temperatures. *Nature*. 1949; 164: 666–7.
 45. Polge C, Rowson LEA. Fertilizing capacity of bull spermatozoa after freezing at –79°C. *Nature*. 1952; 169: 626–7.
 46. Reed ML, Ezeh PC, Hamic A, et al. Soy lecithin replaces egg yolk for cryopreservation of human sperm without adversely affecting post thaw motility, morphology, sperm DNA integrity, or sperm binding to hyaluronate. *Fertil Steril*. 2009; 92(5): 1787–90.
 47. Ribas-Maynou J, Garcia-Bonavila E, Hidalgo CO, et al. Species-specific differences in sperm chromatin decondensation between eutherian mammals underlie distinct lysis requirements. *Front Cell Dev Biol*. [Internet] 2021 Apr 30 [cited 2021 Sep 30]; 9: 669182. Available from: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fcell.2021.669182/full>
 48. Rui BR, Angrimani D, Bicudo LC, et al. A fast, low-cost and efficient method for the diagnosis of sperm DNA fragmentation in several species. *Reprod Domest Anim*. 2018; 53(1): 171–5.
 49. Saadeldin IM, Khalil WA, Alharbi MG, et al. The current trends in using nanoparticles, liposomes, and exosomes for semen cryopreservation. *Animals* [Internet] 2020 Dec 3; [cited 2021 Sep 30] 10(12): 2281. Available from: <https://www.mdpi.com/2076-2615/10/12/2281>
 50. Sabés-Alsina M, Johannisson A, Lundeheim N, et al. Effects of season on bull sperm quality in thawed samples in northern Spain. *Vet Rec*. [Internet] 2017 Mar 11; [cited 2021 Sep 11] 180(10):251. Available from: <https://bvajournals.onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1136/vr.103897>
 51. Sakkas D, Mariethoz E, Manicardi G, et al. Origin of DNA damage in ejaculated human spermatozoa. *Rev Reprod*. 1999; 4(1): 31–7.
 52. Salamon S, Maxwell WM. Storage of ram semen. *Anim Reprod Sci*. 2000; 62: 77–111.
 53. Saleh RA, Agarwal A. Oxidative stress and male infertility: from research bench to clinical practice. *J Androl*. 2002; 23(6): 737–52.
 54. Santiani A, Evangelista S, Valdivia M, et al. Effect of the addition of two superoxide dismutase analogues (tempo and tempol) to alpaca semen extender for cryopreservation. *Theriogenology*. 2013; 79(5): 842–6.
 55. Serafini R, Romano JE, Varner DD, et al. Sperm DNA assays and their relationship to sperm motility and morphology in bulls (*Bos taurus*). *Anim Reprod Sci*. 2015; 159: 77–86.
 56. Serafini R, Varner DD, Bissett W, et al. Sperm DNA quality evaluated by comet assay and sperm chromatin structure assay in stallions after unilateral orchiectomy. *Theriogenology*. 2015; 84: 833–7.
 57. Shamsi MB, Imam SN, Dada R. Sperm DNA integrity assays: diagnostic and prognostic challenges and implications in management of infertility. *J Assist Reprod Genet*. 2011; 28(11): 1073–85.

45. Polge C, Rowson LEA. Fertilizing capacity of bull spermatozoa after freezing at -79°C . *Nature*. 1952; 169: 626–7.
46. Reed ML, Ezeh PC, Hamic A, et al. Soy lecithin replaces egg yolk for cryopreservation of human sperm without adversely affecting post thaw motility, morphology, sperm DNA integrity, or sperm binding to hyaluronate. *Fertil Steril*. 2009; 92(5): 1787–90.
47. Ribas-Maynou J, Garcia-Bonavila E, Hidalgo CO, et al. Species-specific differences in sperm chromatin decondensation between eutherian mammals underlie distinct lysis requirements. *Front Cell Dev Biol*. [Internet] 2021 Apr 30 [cited 2021 Sep 30]; 9: 669182. Available from: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fcell.2021.669182/full>
48. Rui BR, Angrimani D, Bicudo LC, et al. A fast, low-cost and efficient method for the diagnosis of sperm DNA fragmentation in several species. *Reprod Domest Anim*. 2018; 53(1): 171–5.
49. Saadeldin IM, Khalil WA, Alharbi MG, et al. The current trends in using nanoparticles, liposomes, and exosomes for semen cryopreservation. *Animals* [Internet]. 2020 Dec 3 [cited 2021 Sep 30]; 10(12): 2281. Available from: <https://www.mdpi.com/2076-2615/10/12/2281>
50. Sabés-Alsina M, Johannisson A, Lundeheim N, et al. Effects of season on bull sperm quality in thawed samples in northern Spain. *Vet Rec*. [Internet] 2017 Mar 11 [cited 2021 Sep 11]; 180(10):251. Available from: <https://bvajournals.onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1136/vr.103897>
51. Sakkas D, Mariethoz E, Manicardi G, et al. Origin of DNA damage in ejaculated human spermatozoa. *Rev Reprod*. 1999; 4(1): 31–7.
52. Salamon S, Maxwell WM. Storage of ram semen. *Anim Reprod Sci*. 2000; 62: 77–111.
53. Saleh RA, Agarwal A. Oxidative stress and male infertility: from research bench to clinical practice. *J Androl*. 2002; 23(6): 737–52.
54. Santiani A, Evangelista S, Valdivia M, et al. Effect of the addition of two superoxide dismutase analogues (tempo and tempol) to alpaca semen extender for cryopreservation. *Theriogenology*. 2013; 79(5): 842–6.
55. Serafini R, Romano JE, Varner DD, et al. Sperm DNA assays and their relationship to sperm motility and morphology in bulls (*Bos taurus*). *Anim Reprod Sci*. 2015; 159: 77–86.
56. Serafini R, Varner DD, Bissett W, et al. Sperm DNA quality evaluated by comet assay and sperm chromatin structure assay in stallions after unilateral orchiectomy. *Theriogenology*. 2015; 84: 833–7.
57. Shamsi MB, Imam SN, Dada R. Sperm DNA integrity assays: diagnostic and prognostic challenges and implications in management of infertility. *J Assist Reprod Genet*. 2011; 28(11): 1073–85.
58. Shi Y, Buffenstein R, Pulliam DA, et al. Comparative studies of oxidative stress and mitochondrial function in aging. *Integr Comp Biol*. 2010; 50(5): 869–79.
59. Tasic J, Walton A. Formation of hydrogen peroxide by spermatozoa and its inhibitory effect of respiration. *Nature*. 1946; 158: 485.
60. Uysal O, Bucak MN. Effects of oxidized glutathione, bovine serum albumin, cysteine and lycopene on the quality of frozen-thawed ram semen. *Acta Vet Brno*. 2007; 76(3): 383–90.
61. Varesi S, Vernocchi V, Morselli MG, et al. DNA integrity of fresh and frozen canine epididymal spermatozoa. *Reprod Biol*. 2014; 14(4): 257–61.
62. Yurchuk TO, Pavlovich OV, Gapon GO, et al. Lipid peroxidation and DNA fragmentation in fresh and cryopreserved spermatozoa of men at different spermatogenesis state. *Ukr Biochem J*. 2021; 93(3): 24–9.
63. Yurchuk T, Petrushko M, Gapon A, et al. The impact of cryopreservation on the morphology of spermatozoa in men with oligoasthenoteratozoospermia. *Cryobiology*. 2021; 100: 117–24.

