

Funkcje plemnika a płodność męska

dr R. Faúndez

**Zakład Rozrodu Zwierząt, Andrologii i Biotechnologii Rozrodu
Laboratorium Biotechnologii WCB
Katedra Chorób Dużych zwierząt z Kliniką
Wydział Medycyny Weterynaryjnej SGGW**

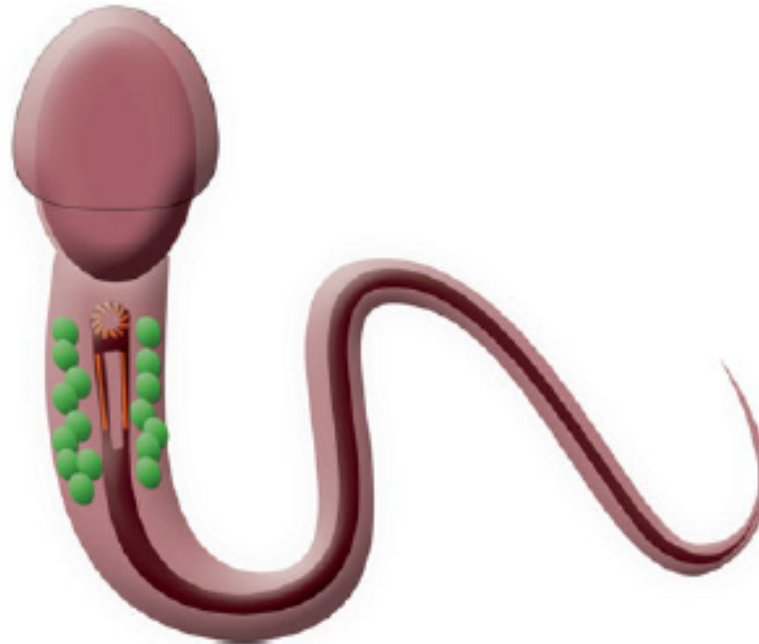


Fig. 1 Depiction of a spermatozoon. The head, composed mostly of the nucleus, is partly covered by the cap-like acrosome, an organelle containing enzymes. The tail of this sperm consists of three regions, the midpiece holds the mitochondria and centrosome, principal piece, and end piece

TABLE 1. Male infertility history.

Infertility history	IHH
Duration	Pituitary diseases/tumour
Previous partner	Surgical history
Previous pregnancies	Trauma
Previous infertility therapy	Penis
Partner's fertility status	Chordee
Sexual history	Hypospadias
Timing and frequency of sex	Urethroplasty
Libido and erectile function	Scrotum
Lubricants	Orchiopexy
Ejaculatory status and volume	Orchiectomy
Developmental and childhood history	Torsion
Undescended testicles	Vasectomy
Pre-pubertal hypogonadism	Inguinal
Congenital syndromes	Orchidopexy
Infection history	Hernia
Viral febrile infection	Pelvis
Sexually transmitted	Bladder neck surgery
HIV	TURP
Gonorrhea	Retroperitoneum
Chlamydia	Fibrosis
Bacterial	RPLND
Atypical (mycoplasma)	Social history
Prostatitis	Environmental exposures
Epididymitis	Chemicals
Tuberculosis	Radiation
Post-pubertal mumps orchitis	Recreational drugs
Medical history	Tobacco use
Systemic illnesses	Heat exposure
Diabetes	Stress
Chronic liver disease	Anabolic-androgenic steroids
Renal failure	Family history
Thyroid disease	Cystic fibrosis
Malnutrition	Male infertility
Metabolic syndrome	Hypogonadism
Blood dyscrasias	Medications
Neurologic disease	Review of systems
Multiple sclerosis	Headache
Transverse myelitis	Visual field changes
Spinal cord injury	Galactorrhea
Cancer	Gynecomastia
Cystic fibrosis	Anosmia
Post-pubertal hypogonadism	
Klinefelter's syndrome	

TURP transurethral resection of the prostate; RPLND retroperitoneal lymph node dissection; IHH isolated hypogonadotropic hypogonadism

Table 1
List of genes involved in the different developmental stages of male fertility in this chapter

Primordial germ cell specification	<i>Bmp4</i>	<i>Bmp8b</i>	<i>Dnd1</i>	<i>Kit</i>	<i>Kitl</i>	<i>Prdm1</i>	<i>Prdm14</i>	<i>Smad1</i>	<i>Smad5</i>												
Sex determination	<i>Amb</i>	<i>Amhr2</i>	<i>Rspo1</i>	<i>Sox3</i>	<i>Sox9</i>	<i>Sry</i>															
HPG axis	<i>Fshb</i>	<i>Gnrh1</i>	<i>Kis1</i>	<i>Kis1r</i>	<i>Lhb</i>																
Meiosis	<i>Cdk2</i>	<i>Dmcl</i>	<i>Mlh1</i>	<i>Mlh3</i>	<i>Msh4</i>	<i>Msh5</i>	<i>Rad51c</i>	<i>Rec8</i>	<i>Smc1b</i>	<i>Spo11</i>	<u><i>Stag3</i></u>	<u><i>Sun1</i></u>	<i>Syp1</i>	<i>Syp2</i>	<i>Syp3</i>	<u><i>Syce1</i></u>	<u><i>Syce2</i></u>	<i>Tex11</i>	<u><i>Tex12</i></u>	<i>Tex15</i>	
AAM complex and morphogenesis	<i>Csnk2a2</i>	<i>Gopc</i>	<i>Hook1</i>	<i>Hrb</i>	<u><i>Pick1</i></u>	<u><i>Rimbp3</i></u>	<i>Zfpb</i>														
Motility and hyperactivated motility	<i>Adcy10</i>	<i>Akap4</i>	<i>Catsper1</i>	<i>Catsper2</i>	<i>Catsper3</i>	<i>Catsper4</i>	<u><i>Catsperb</i></u>	<u><i>Catsperg</i></u>	<u><i>Catsperd</i></u>	<i>Dnabcl</i>	<i>Gaplls</i>	<u><i>Gpx4</i></u>	<i>Ldhc</i>	<i>Odf2</i>	<i>Pcdp1</i>	<u><i>Pgk2</i></u>	<u><i>Slo3</i></u>	<i>Spag6</i>	<i>Spem1</i>	<u><i>Tcte3</i></u>	<i>Tekt2</i>
Obstructive azoospermia	<i>Ar</i>	<u><i>Cftr</i></u>																			

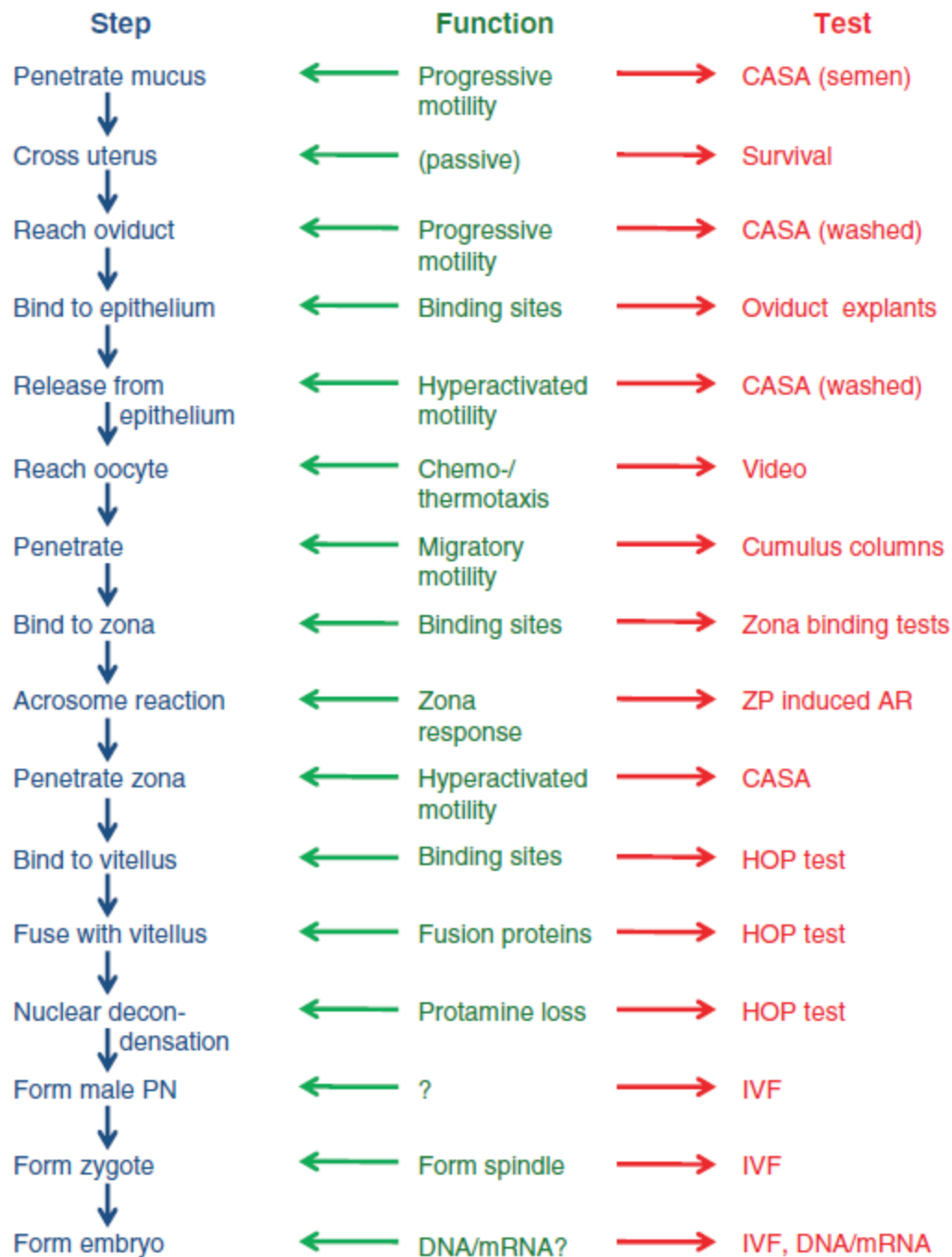
Genes that were not included in the list of male fertility mouse models (Fig. 5) in the *Nature Medicine* review article by Matzuk and Lamb [98] are underlined in this table

TABLE 2. Distribution of diagnoses for male infertility (World Health Organization; $n=7,057$) Adapted from EAU guidelines on male infertility 2005; with permission

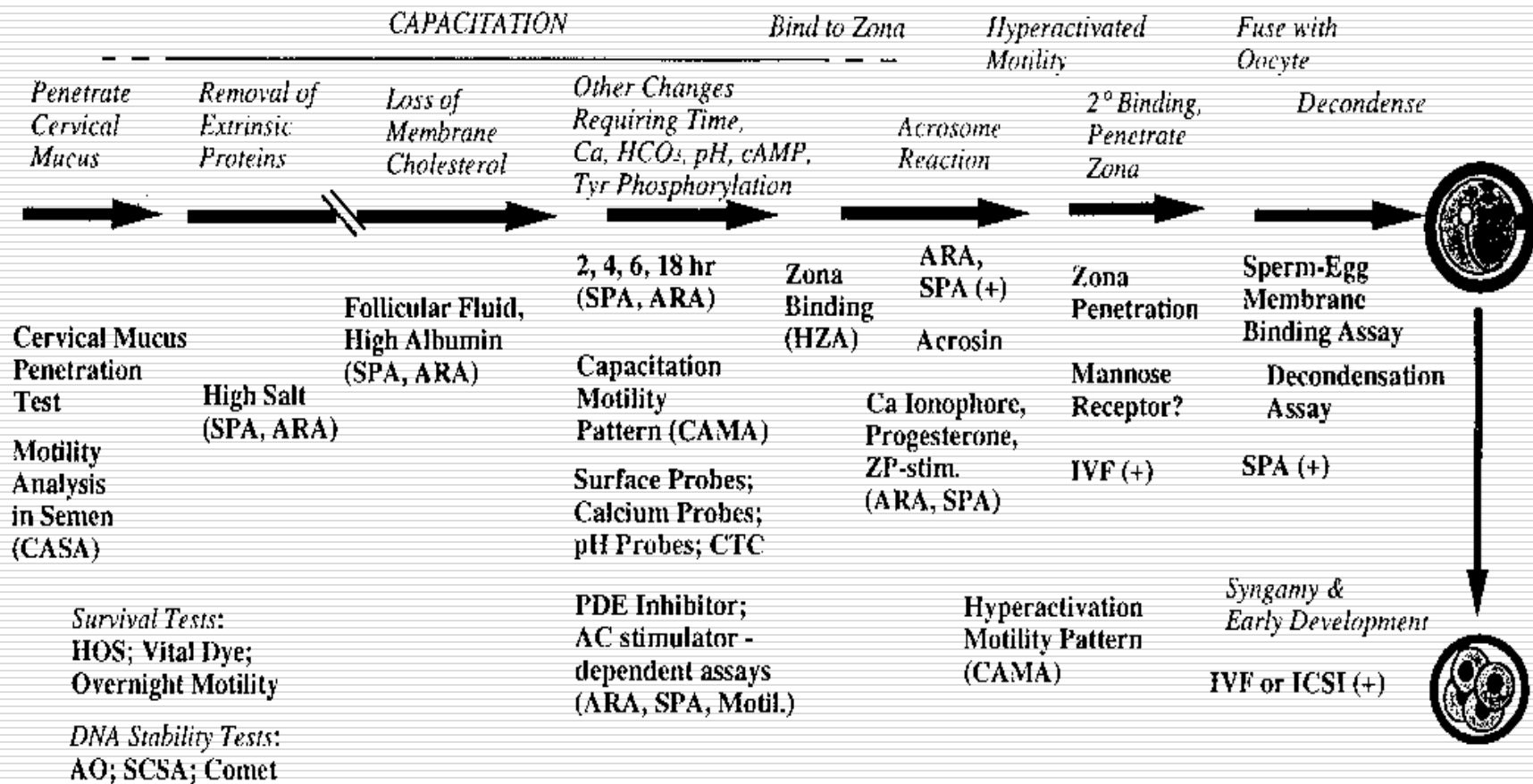
Diagnosis	Percentage (%)
Idiopathic	48.5
Idiopathic abnormal semen analysis	26.4
Varicocele	12.3
Infection	6.6
Immunologic factor	3.1
Other abnormalities	3.0
Acquired factor	2.6
Congenital anomaly	2.1
Coital factor	1.7
Endocrine abnormality	0.6

Fig. 10.1 Sperm function tests and their relation to physiology

Scheme of the steps in the fertilization process (*left column*), the sperm functions involved (*middle column*) and the tests available to check these functions (*right column*). AR, acrosome reaction; CASA, computer-aided sperm analysis; HOP, hamster oocyte penetration; IVF, in vitro fertilization; PN, pronucleus; ZP, zona pellucida. We thank Professor Dr. F Ochsendorf, Centre for Dermatology and Venerology, Johann Wolfgang Goethe University, Frankfurt am Main, for the idea for Fig. 10.1



EVENTS LEADING TO FERTILIZATION

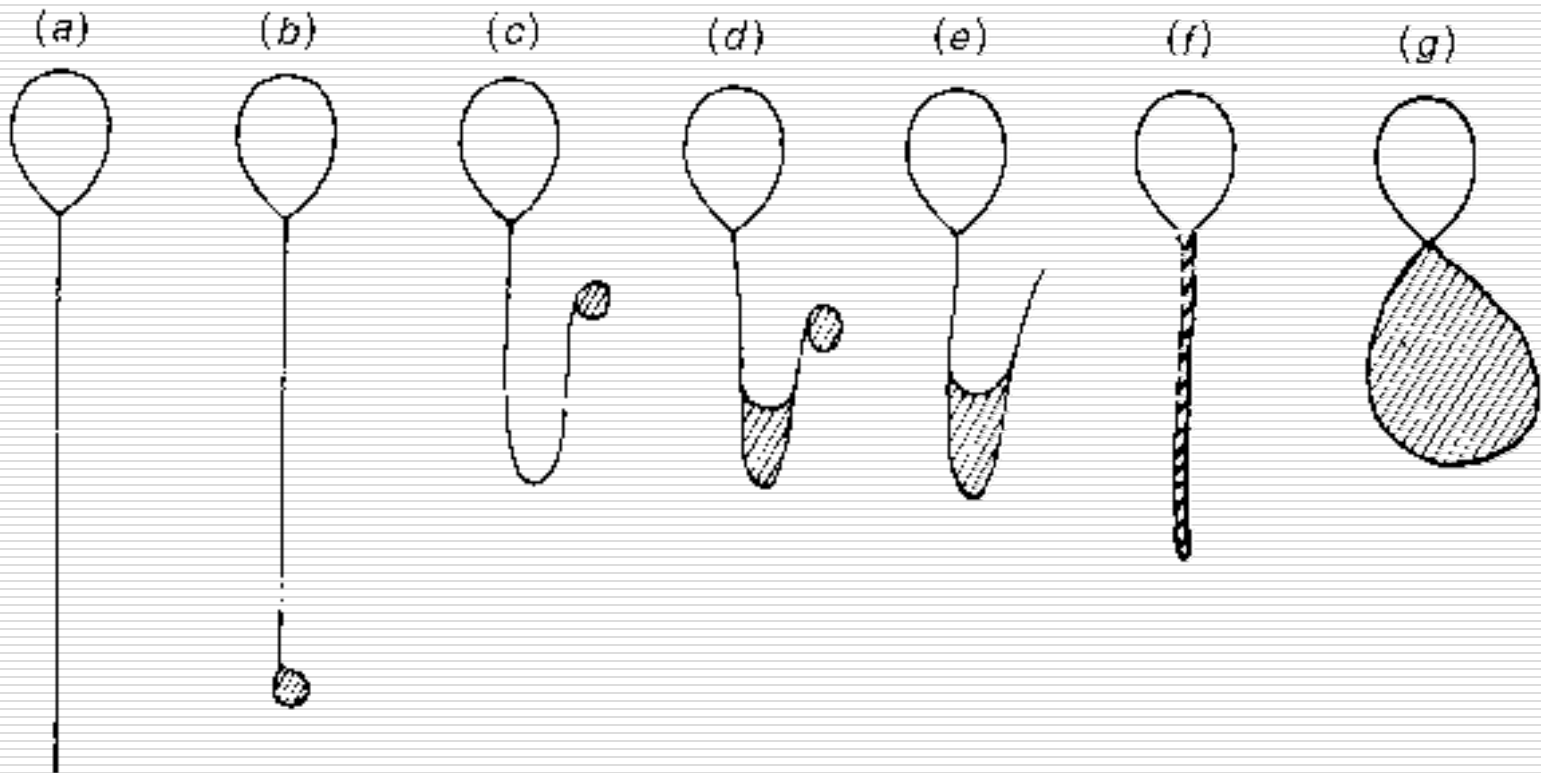


TESTS OF SPERM FUNCTIONS

Testy określające funkcji plemnika

- Standardowa analiza nasienia wg WHO 2010
 - Komputerowa analiza plemników - CASA oraz ruchliwości plemnika CAMA
 - Testy funkcjonalne
 - Testy reakcji akrosomowej (ARA, ARIC, CTC, Acrosin, TST, FLL)
 - Testy przeżywalności plemników in vitro
 - Test integralności DNA - AO, SCSA, TUNEL, COMET, SCD)
 - Test integralności błon plemników (HOS-Test: Hypo-osmotic swelling test)
 - Określenie poziomu wolnych rodników
 - Testy kapacytacji plemników (Sperm capacitation assays)
 - Test wiązania się plemnika do połówek osłonki (Hemizona-binding assay)
 - Test wiązania z hialuronianem (kwasem hialuronowym) HBA (Hyaluronan Binding Assay).
 - Test penetracji jaj chomiczych (Hamster penetration test – HPT, SPA)
 - Test penetracji oocytów ludzkich (Human sperm-zona penetration assay)
 - IVF lub ICSI
-

HOS Test



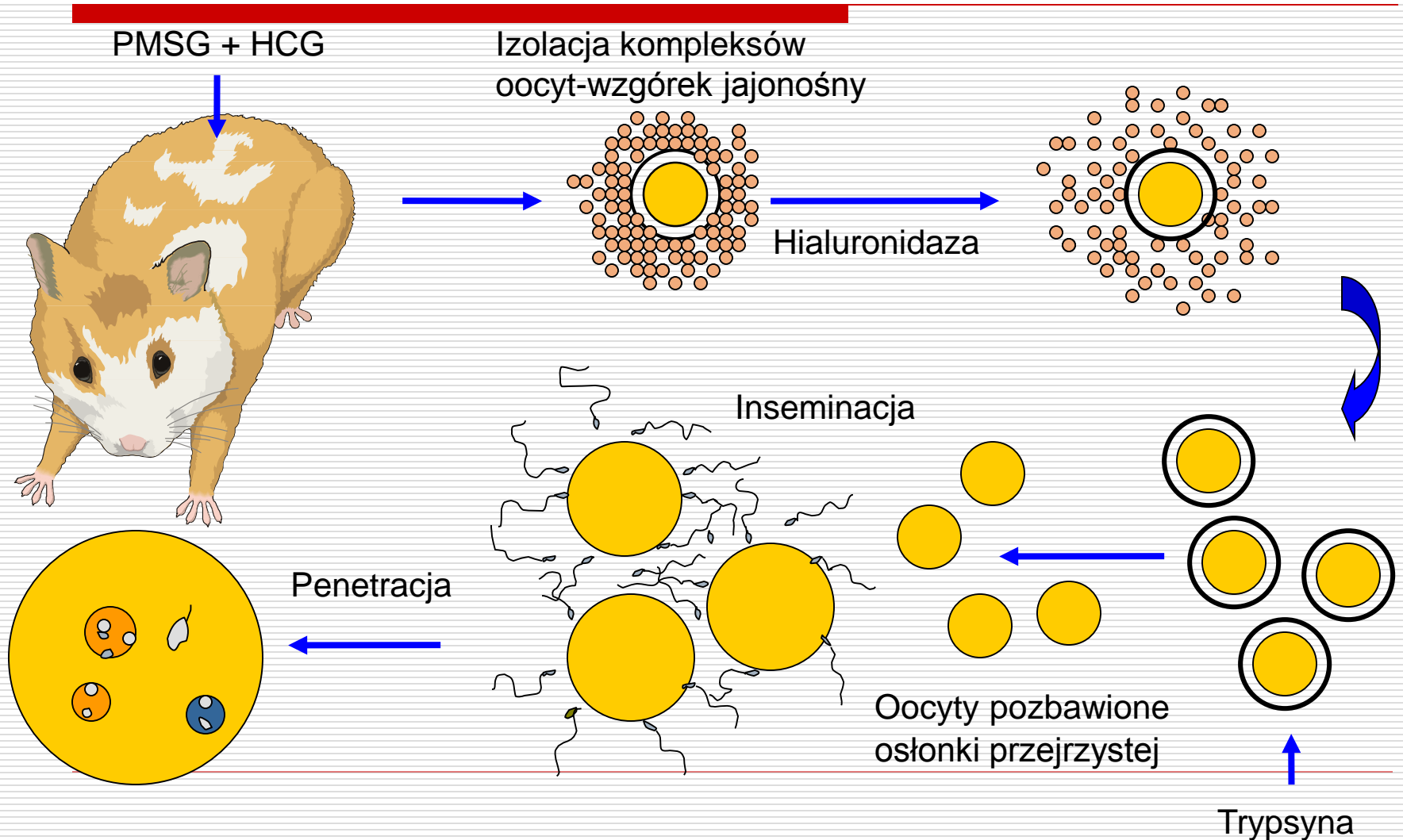
Wyniki HOS Testu a spermogram

HOST %	Liczba plemników 10 ⁶ /ml	Ruchliwość postępową a+b	Żywotność %
> 60	72,8 ± 60,4**	50,8 ± 16,1**	62,0 ± 9,3*
50 – 60	59,1 ± 46,7	49,0 ± 18,2	60,6 ± 11,8
< 50	41,6 ± 40,7	40,8 ± 19,1	56,7 ± 12,9

* P ≤ 0,05, ** P ≤ 0,01

Wg. Faundez i wsp. 1992

Test penetracji oocytów chomiczych plemnikami ludzkimi (SPA, HEPT)



Test chomiczy (SPA)

	% penetracji			
	≤ 15	15-50	≥ 50	Σ
Liczba pacjentów	5	16	20	41
Ze spermogramem prawidłowym	0	6	14	20
Ze spermogramem nieprawidłowym	5	10	6	21

SPA

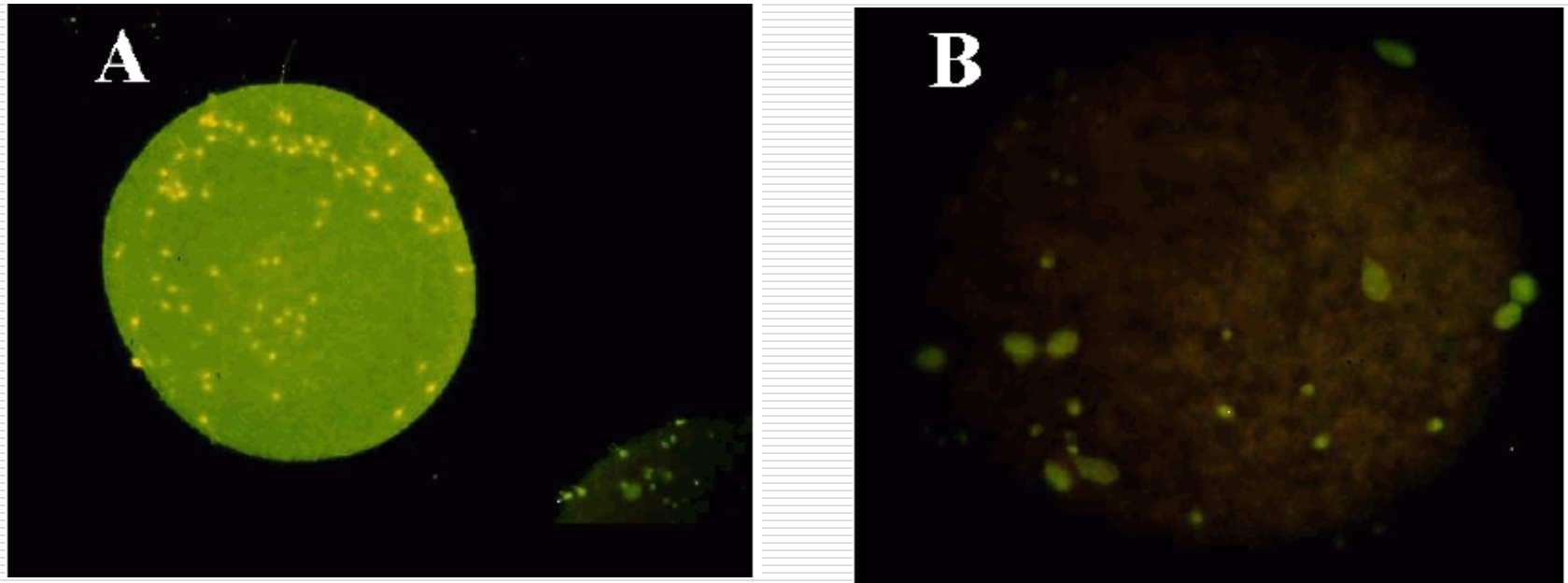


Figure 1: Fluorescent microscopy of acridine orange stained zona-free hamster oocytes, after exposure to capacitated human sperm. In A, sperm is bound to the oocyte but no penetration is seen. In B, sperm has penetrated the oocyte.

Badanie reakcji akrosomowej metodą fluorescencyjną (CTC)

- Indukcja reakcji akrosomowej
 - Roztwór 0,5 mM jonoforu A23187 w DMSO
- Wywołanie AR
 - 10 μ l 0,5 mM roztworu do 0,5 ml nasienia o koncentracji min. 2mln/ml
 - Mieszaninę inkubuje się przez jedną godzinę w temperaturze 37°C, w atmosferze zawierającej 5 % CO₂
- Barwienie fluorescencyjne akrosomów
 - Bufor o pH 7,8 zawierający 20mM Tris, 130mM NaCl, 5mM cysteiny i 500 μ M. chlortetracykliny (CTC)
 - 100 μ l roztworu CTC do 100 μ l nasienia.
 - Mieszaninę inkubowuje się przez 5 min. w temperaturze 37°C.
 - 2 μ l 12,5% glutaraldehydu w celu utrwalenia fluorescencji
- Plemniki, które ulegają reakcji akrosomowej nie wykazują fluorescencji przedniej części główki plemnika.
- Plemniki z całym akrosomem wykazują trzy rodzaje fluorescencji:
 - EF – jasny pas fluorescencji w regionie postakrosomowym
 - DF – fluorescencja w przedniej części, oraz w regionie postakrosomowym
 - CP – silna fluorescencja całej główki oraz wstawki

Reakcja akrosomowa (AR)



Brak fluorescencji

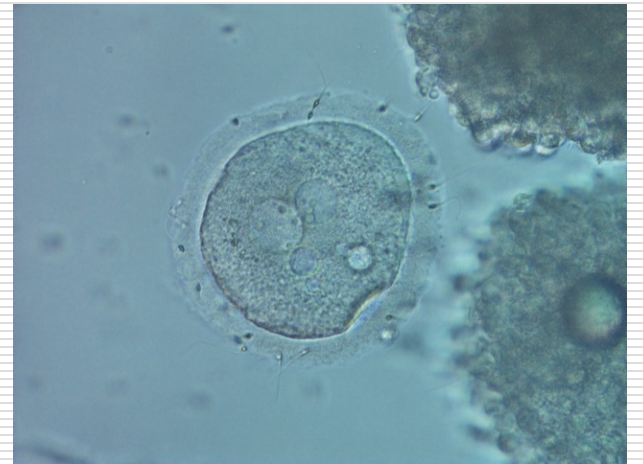
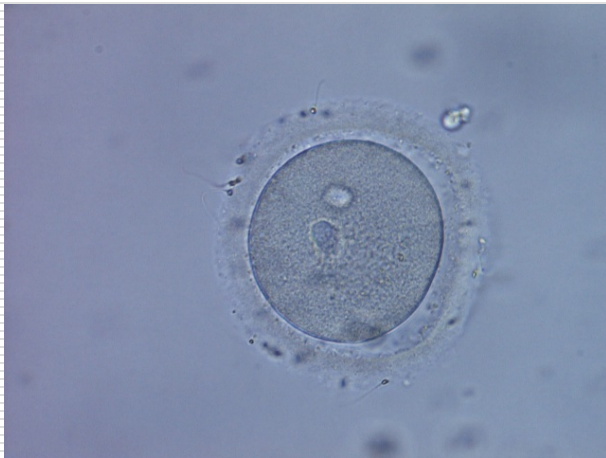
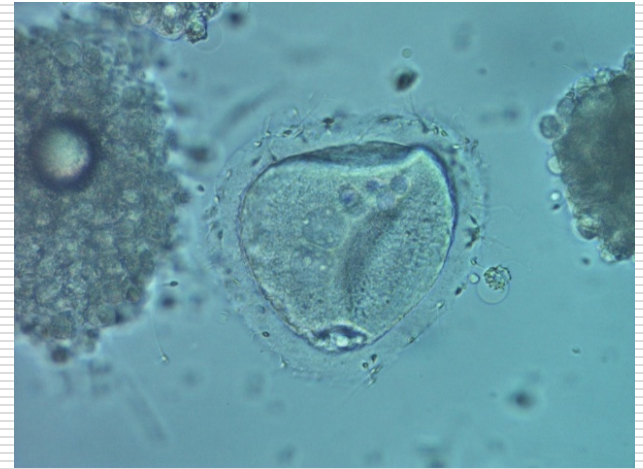
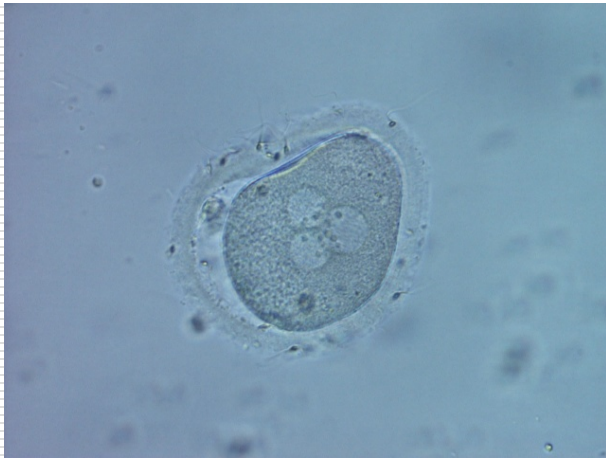


EF – jasny pas fluorescencji
w regionie postakrosomowym

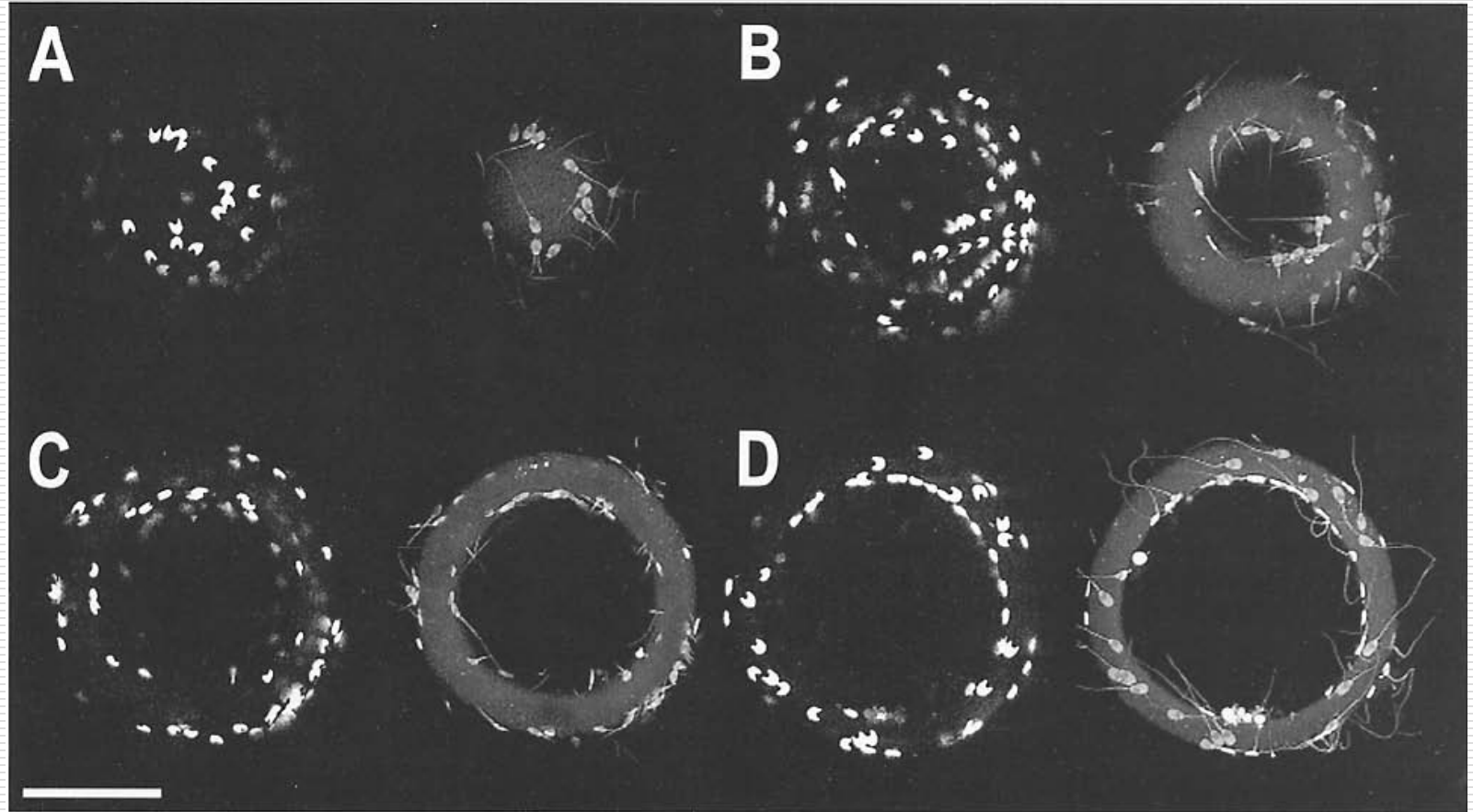


CP – silna fluorescencja

Test przylegania plemników do połówek osłonek przejrzystych HZA



HZA



HZA

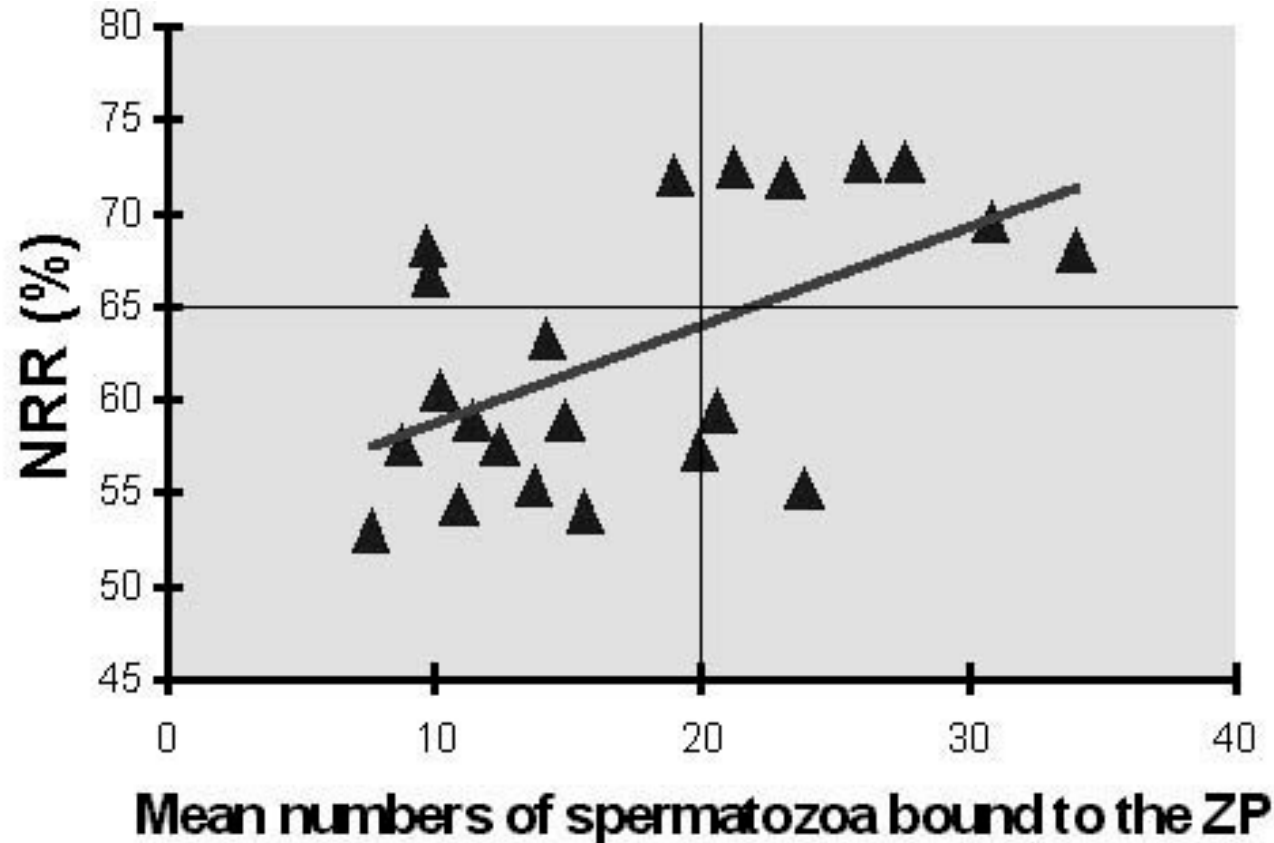
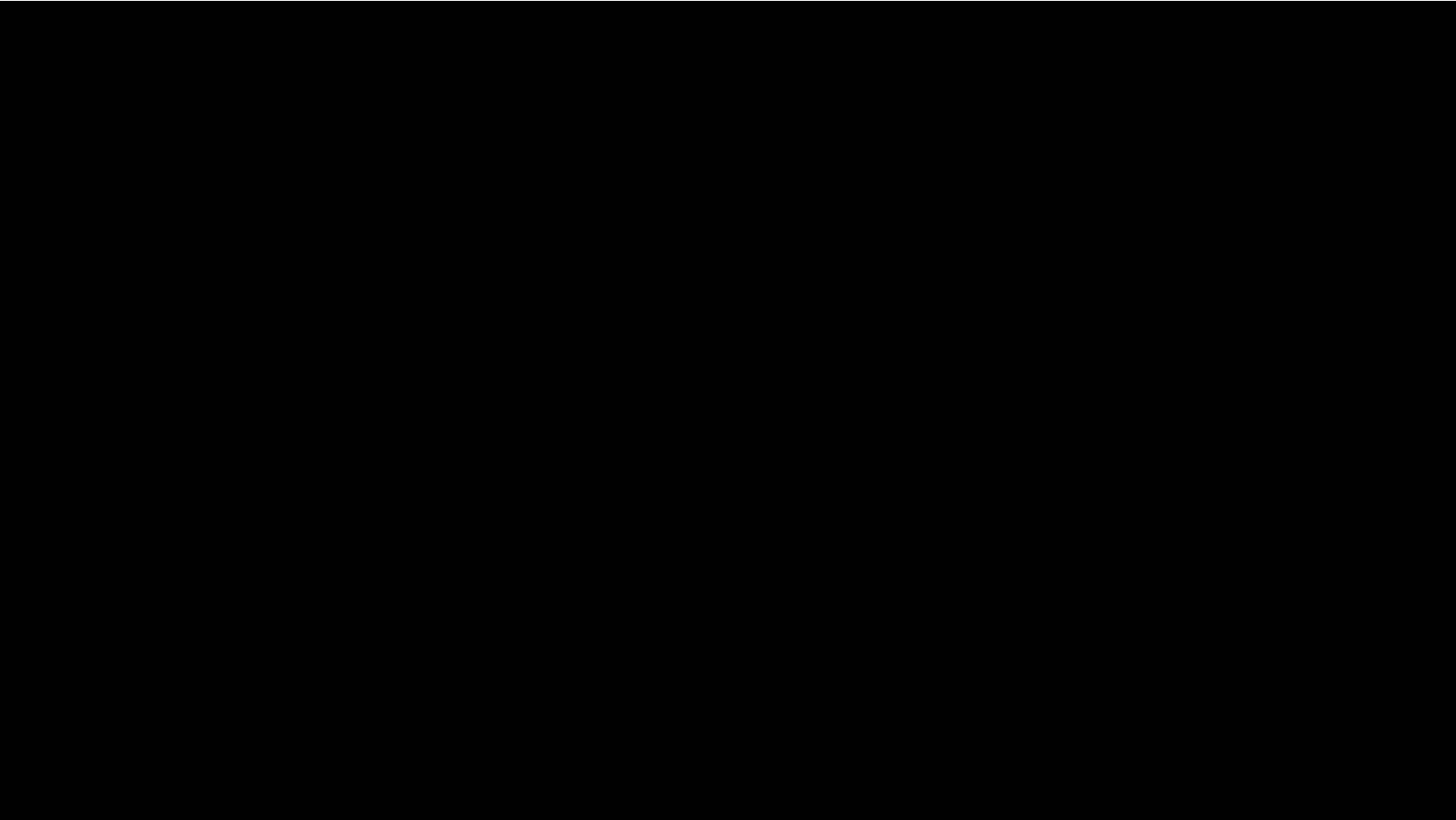


Figure 1. Correlation ($r=0.50$, $P=0.02$, $n=22$) between the mean numbers of bull spermatozoa bound to the ZP and the fertility (56-d NRR) of the bulls tested (modified, from 31). The inner lines mark a threshold of fertility and a median of sperm numbers bound.

HBA i PICSI



IVF Test

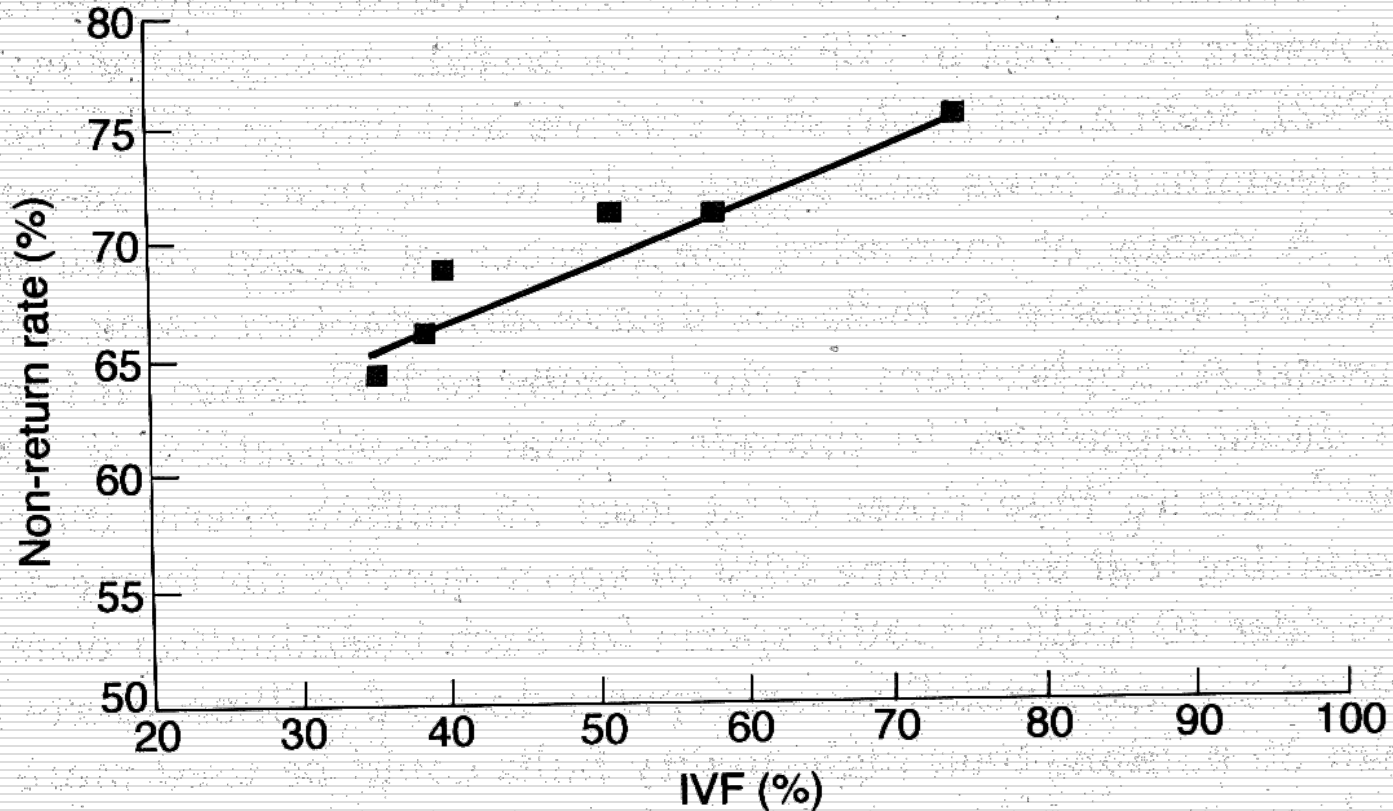


Fig. 4.10. Regression line between field non-return rates and IVF rates with $0.05 \mu\text{g ml}^{-1}$ heparin. $y = 0.22x + 0.58$; $r = 0.83$; $P < 0.01$. (From Marquant-Le Guienne *et al.*, 1990a).

OCENA STRUKTURY CHROMATYNY PLEMNIKÓW

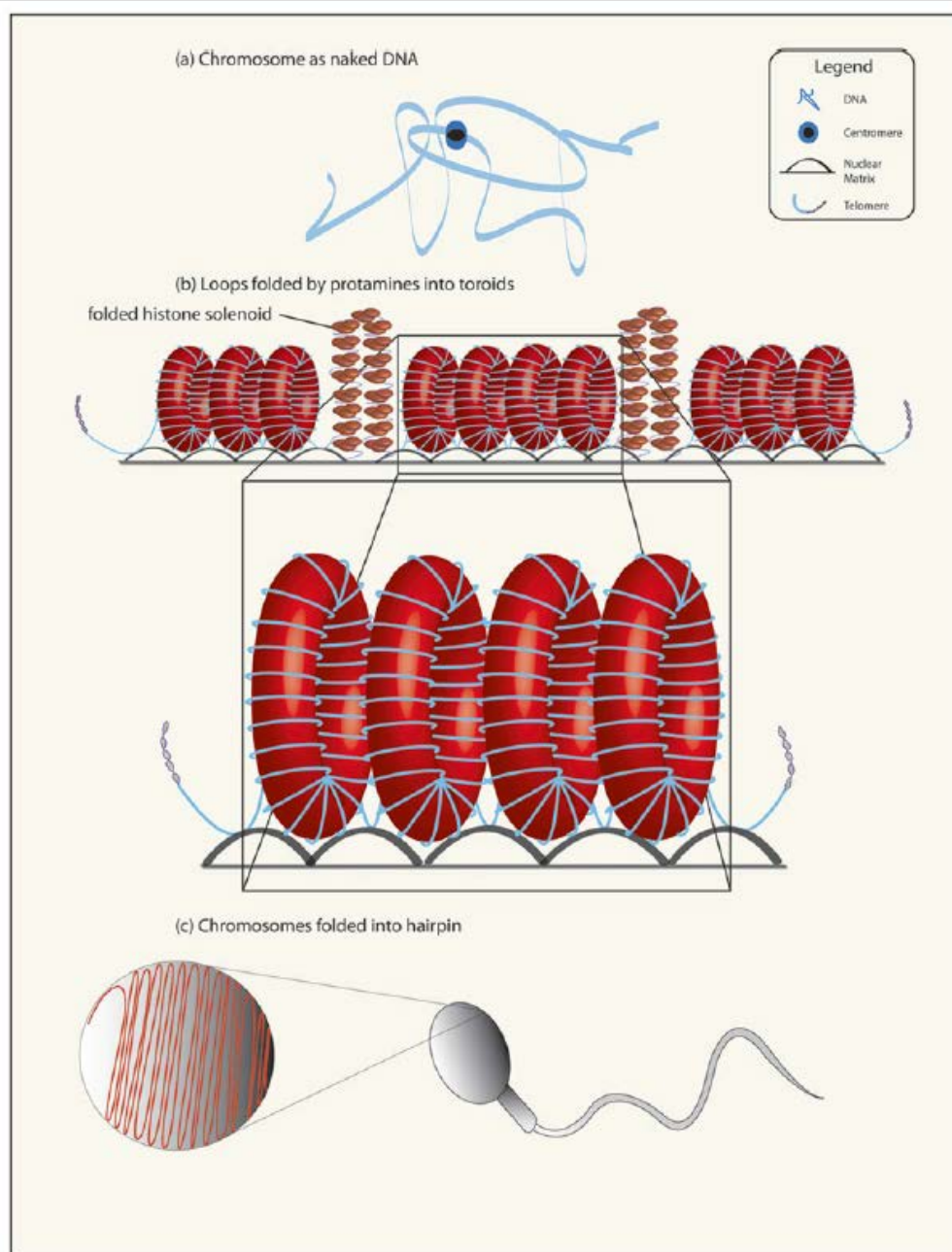


Fig. 4 (a) Chromosomes depicted as naked DNA. (b) “Donut-loop” model for sperm chromatin structure as introduced by Sotolongo et al. [108] that reveals the internal structure of the protamine–DNA fibers within the toroid (*inset*). (c) Chromosomes are folded into a hairpin structure in the sperm head

-
- ◆ Dodatkowy marker zdolności zapłodnienia jest integralność DNA plemników.
 - ◆ Tylko DNA plemnika o wysokiej integralności, czyli prawidłowo skondensowane i niepofragmentowane może ulec dekondensacji po wnikięciu plemnika do dojrzałego oocytu.
-

Procesy stabilizujące chromatyny plemników

➤ Prawidłowa kondenzacja

❖ Protaminacja

❖ Oksydacja wolnych grup tiolowych protamin

❖ Procesy protaminacji i oksydacji są niezbędne do prawidłowej kondensacji DNA plemnikowego.

❖ Nieprawidłowa depozycja protamin lub niekompletna oksydacja może prowadzić do wzrostu wrażliwości DNA na uszkodzenia

➤ Brak frakmentacji DNA

Fragmentacja DNA

- ❑ Powodem fragmentacji DNA plemników ejakulowanych może być obecność endogennych nacięć w łańcuchach DNA plemników.
 - ❑ Zjawisko to jest charakterystyczne dla apoptozy, jaką obserwujemy w przypadku komórek somatycznych.
 - ❑ W tym kontekście apoptoza prowadzi do eliminacji defektywnych komórek zarodkowych z puli genetycznej.
-

Źródła nieprawidłowości chromatyny plemników

- Stres oksydacyjny:
 - Peroksydacja lipidów błonowych (*Jones et al., 1979*)
 - Uszkodzenia DNA mitochondrialnego i genomowego (*Aitken, Krausz, 2001*)

 - Nieprawidłowa aktywność topoizomerazy II, zaburzenia w wymianie protamin (*Bianchi 1993; Mcpherson, Longo, 1993; Manicardi 1995; Sailer 1995*)

 - Zmiany apoptotyczne
-

- Plemniki mężczyzn o obniżonej płodności mogą wykazywać zmiany w organizacji chromatyny:

-
- Zmiany epigenetyczne
 - Złamania w podwójnej lub pojedynczej nici DNA
 - Nieprawidłowa liczba chromosomów
 - Mikrodelecje chromosomu Y (Seli, Sakkas 2005)

- Fragmentacja DNA może być jednym z głównych powodów spadku płodności mężczyzn (in vivo i in vitro)

(Sun et al., 1997; Duran et al., 2002; Benchaib et al., 2003; Henkel, 2003, 2004; Larson-Cook, 2003; Lewis, 2004; Borini, 2006)

Fragmentacja DNA – „konsekwencje”!!

- Obniżona zdolność do zapłodnienia *in vivo*:
 - przyłączenie do komórek nabłonka jajowodu
 - hiperaktywacja i łączenie się z *zona pellucida*
- Obniżona możliwość dekondensacji materiału genetycznego
- Nieprawidłowy podział zygoty i wczesny rozwój zarodka
- Częstsze wczesne i spontaniczne poronienia
- Podwyższone ryzyko uszkodzenia genomu wynikające z braku mechanizmów naprawczych DNA
- ~~Ryzyko przeniesienia wad genetycznych na potomstwo~~

Uszkodzenie DNA plemników

- Złamania w ssDNA lub dsDNA**
 - Regiony otaczające domeny pętlowe (MAR) - bogate w histony**
 - Włókna chromatynowe na powierzchni toroidów protaminowych**
 - Włókna chromatynowe wewnątrz toroidu – najmniej podatne na uszkodzenia**
-

Testy oceniające integralność DNA

□ Ocena stabilności i kondensacji chromatyny

- AAB (Acidic Aniline Blue Stain)

□ Ocena integralności DNA

- SCSA (Sperm Chromatin Structure Assay)
 - Comet (SCGE-single cell gel electrophoresis)
 - TUNEL (terminal deoksynucleotidyl transferases dUTP and labeling)
 - DBD FISH (DNA Break Detection Fluorescent *in situ* Hybridization)
 - SCD (Sperm Chromatin Dispersion)
-

AAB (Acidic Aniline Blue Stain)

- ❑ **Barwnik daje pozytywną reakcję dla lizyny; w konsekwencji niedojrzałe plemniki, których jądra histony bogate są w lizynę, wyróżniają się intensywnym zabarwieniem**
- ❑ **Wyniki testu wskazują na zaburzenia protaminacji podczas spermatogenezy**
- ❑ **Poziom kondensacji DNA jest skorelowany z obecnością złamań w łańcuchu DNA monitorowanych testem TUNEL i Comet**

Test TUNEL

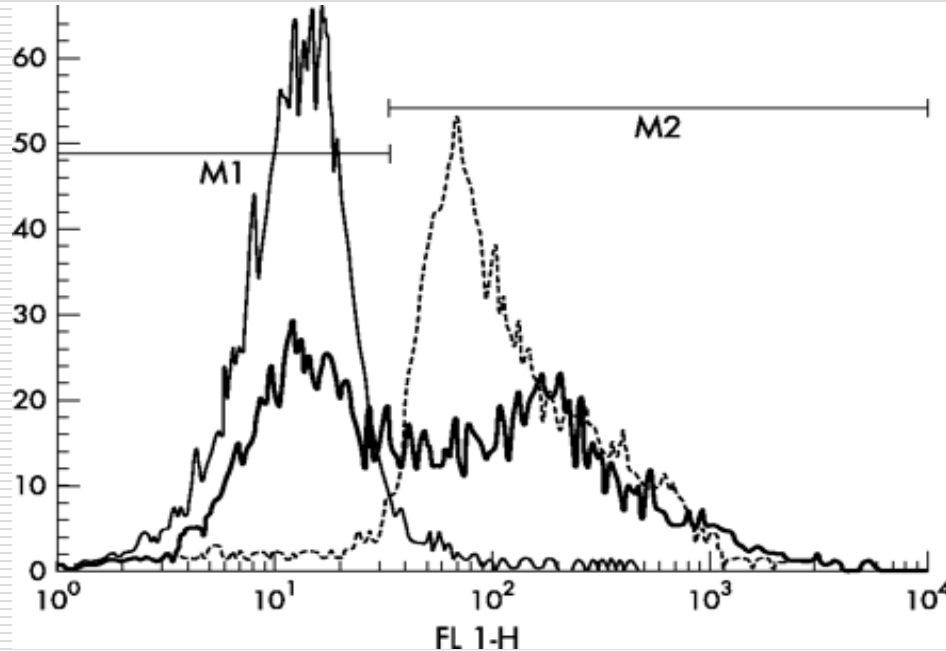
(terminal deoksynucleotidyl transferases
dUTP and labeling)

- ❑ **Test TUNEL ocenia stopień fragmentacji DNA**
- ❑ **Metoda bezpośrednia testu: dołączenie do wolnego końca 3'OH w łańcuchu DNA substratu dUTP znakowanego fluoresceiną (FITC – fluorescein isothiocyanate)**
- ❑ **Metoda pośrednia testu: do detekcji wbudowanego substratu dUTP używa się przeciwciała monoklonalne znakowane FITC skierowane przeciwko substratowi**
- ❑ **Wiązanie dUTP do końców DNA katalizuje terminalna deoksynukleotydylotransferaza (TdT)**

Test TUNEL cd.

- Obecność nacięć w łańcuchu DNA wyznakowanych sondą fluorescencyjną można obserwować w mikroskopie fluorescencyjnym, jako świecenie w obrębie główki plemnika (są to tzw. komórki TUNEL-pozytywne)
 - Kontrola pozytywna - dodatek DNA-zy I indukującej fragmentację DNA
 - W kontroli negatywnej nie dodaje się transferazy terminalnej - brak świecenia
 - Analizę fluorescencji można wykonać ilościowo przy użyciu cytometru przepływowego. Ocenia się odsetek komórek TUNEL-pozytywnych (o pofragmentowanym DNA) i TUNEL-negatywnych (nie zawierających nacięć w łańcuchu DNA)
-

Test TUNEL cd.



Ryc. Histogram testu TUNEL dla plemników ludzkich. Analiza cytometryczna. Lewy pik: kontrola negatywna bez dodatku terminalnej transferazy (4% komórek TUNEL-pozytywnych – fragmentacja DNA). Prawy pik: kontrola pozytywna – plemniki traktowano DNA-zą I (30min , RT) – wzrost odsetka komórek TUNEL-pozytywnych do 96%. Dolny pik: próbka nasienia badanego (54% komórek TUNEL-pozytywnych)

Metody cytometrii przepływowej w oceny integralności DNA plemników.

- SCSA (Sperm chromatin structure assay) – test oceniający stabilność chromatyny
 - Test z bromkiem etydyny oceniający stopień kondensacji chromatyny.
-

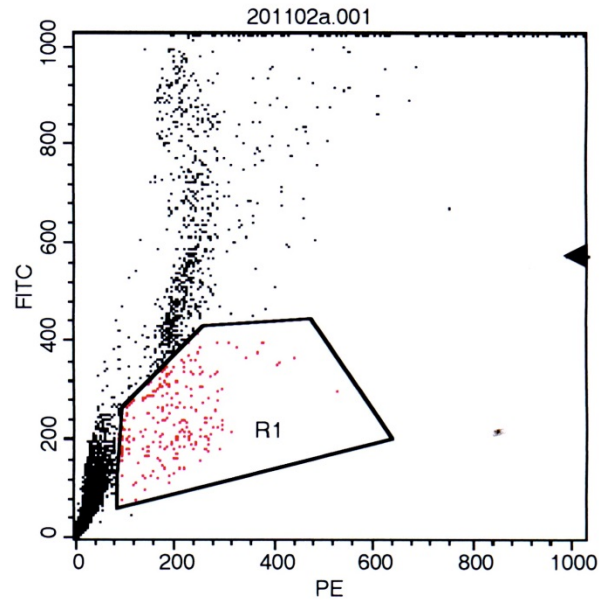
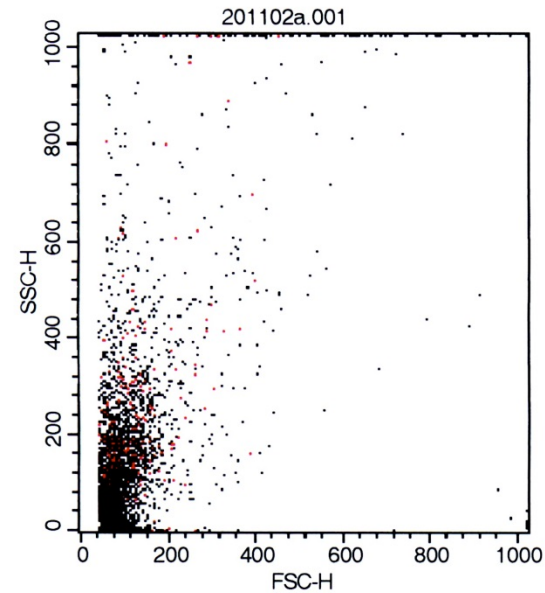
Metody cytometryczne oceny integralności DNA plemników.

- ❑ Test SCSA opisany przez Evenson i wsp wykorzystywany jest zarówno w ocenie integralności chromatyny plemników zwierzęcych jak i ludzkich.
 - ❑ Monitoruje wrażliwość DNA na denaturację kwaśną lub termiczną indukowaną in situ.
 - ❑ Wykorzystuje metachromatyczne właściwości oranżu akrydyny do odróżnienia zdenaturowanego DNA w postaci pojedynczej nici od natywnego DNA.
 - ❑ Nieprzewidywalności procesu kondensacji chromatyny mogą powodować wzrost niestabilności DNA i wrażliwości na stres denaturacyjny.
-

Metody cytometrii przepływowej w oceny integralności DNA plemników.

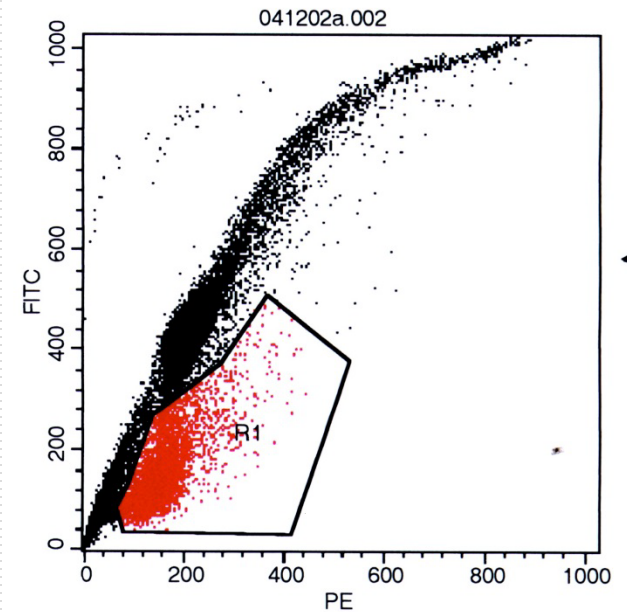
- Różna wrażliwość na denaturację i dostępność barwnika wskazuje na obecność w nasieniu plemników o różnym stopniu upakowania chromatyny.
- Badania wykazały, że DNA plemników jest bardziej odporne na denaturację u grupy płodnych osobników w porównaniu z grupą niepłodnych. U mężczyzn płodność spada, kiedy więcej niż 20% plemników jest identyfikowana przy użyciu SCSA jako plemniki z nieprawidłowo skondensowana chromatyną.
- Możliwość zapłodnienia in vivo spada do zera, gdy populacja z uszkodzonym DNA sięga 40%.

Cytogramy uzyskane dla prób nasienia normozoospermicznego i OAT



File: 201102a.001

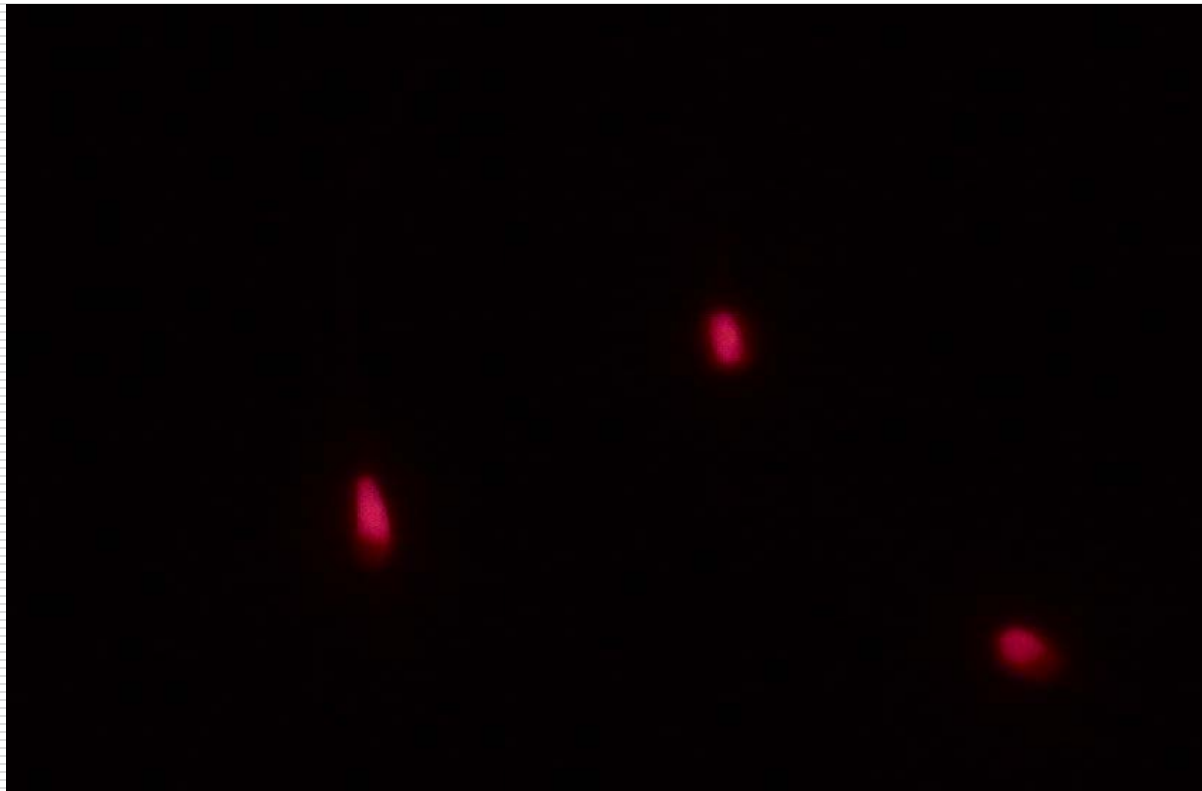
Region	% Gated	X Mean
R1	1.11	192.64



File: 041202a.002

Region	% Gated	X Mean
R1	19.45	156.91

Różny stopień integralności chromatyny plemników (barwienie AO).



Test SCSA

(sperm chromatin structure assay)

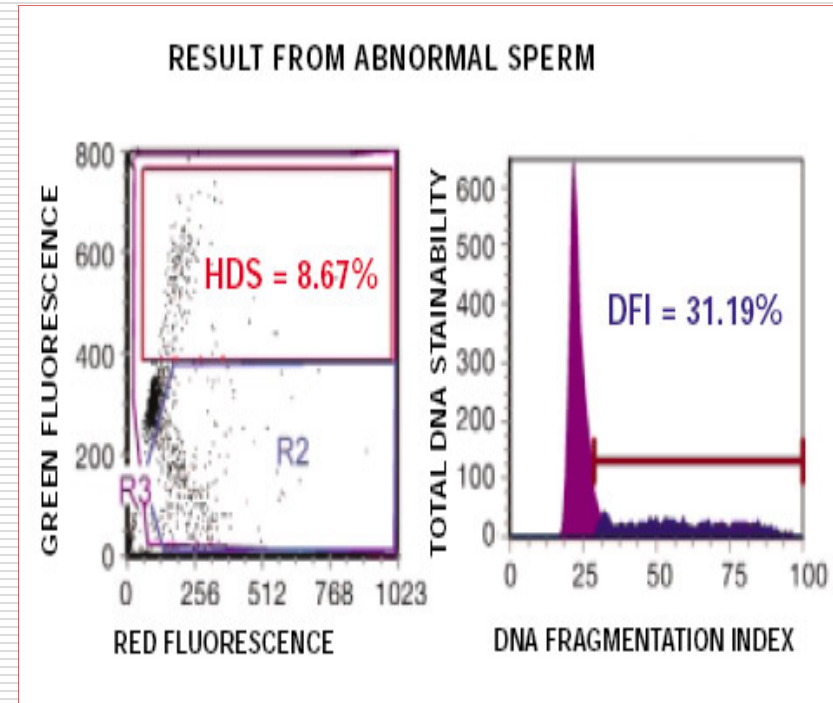
- Test wykorzystuje metachromatyczne właściwości AO (oranż akrydyny) do oceny wrażliwości DNA na kwaśną denaturację (Evenson, Jost, 2000)
-

Test SCSA

(sperm chromatin structure assay)

□ Mierzone parametry to:

- **DFI** – współczynnik fragmentacji DNA (DNA fragmentation index) – określa subpopulacje plemników, których DNA ulega denaturacji, jest w wysokim stopniu pofragmentowane
- **HDS** – (highly DNA stainable) – określa subpopulacje plemników wysoko wiążącą barwnik w wyniku nieprawidłowości kondensacji chromatyny



□ **DFI** jest wysoce stałym parametrem w porównaniu z innymi parametrami w badaniu nasienia (Zini et al., 2001)

Table 1
Semen characteristics and DNA fragmentation level

	DFI	
	Normal (≤ 30)	Abnormal (> 30)
No. of (%)		
Men	138	39
DFI range	2.1–29.7	31.0–91.4
Paternal age (M years \pm SD)		
Concentration (M $\times 10^6$ /ml \pm SD)	62.3 \pm 41*	30.8 \pm 2*
Motility (M% \pm SD)	54.3 \pm 11†	34.9 \pm 15†
Morphology (M% \pm SD)	2.9 \pm 3‡	2.2 \pm 2‡

*†‡ Unpaired student's *t*-test, effect of DNA fragmentation on concentration, motility, and morphology, $P < 0.00001$

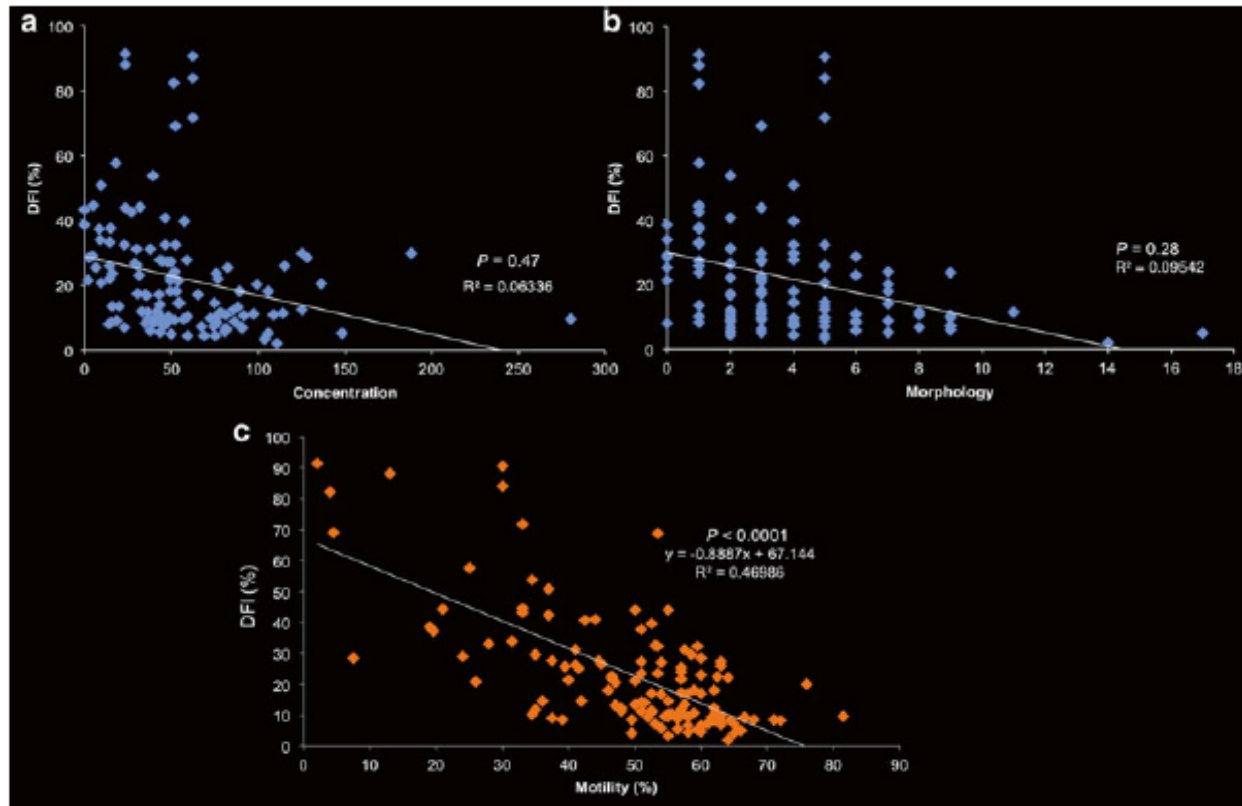


Fig. 5 DNA fragmentation index (DFI) plotted according to semen (a) concentration, (b) morphology, and (c) motility ($P < 0.0001$)

Table 2**Pregnancy outcome according to DNA fragmentation level**

	DFI	
No. of (%)	Normal (≤ 30)	Abnormal (> 30)
Cycles	252	80
DFI (M% \pm SD)	14.5 \pm 8	51.1 \pm 20
Maternal age (M years \pm SD)	37.9 \pm 4	37.9 \pm 4
Fertilization (2PN/MII injected)	1432/2011 (71.2)	445/617 (72.1)
Clinical pregnancies (+FHB)	63 (25.0)	21 (26.2)
Delivery and ongoing	58 (23.0)	18 (22.5)

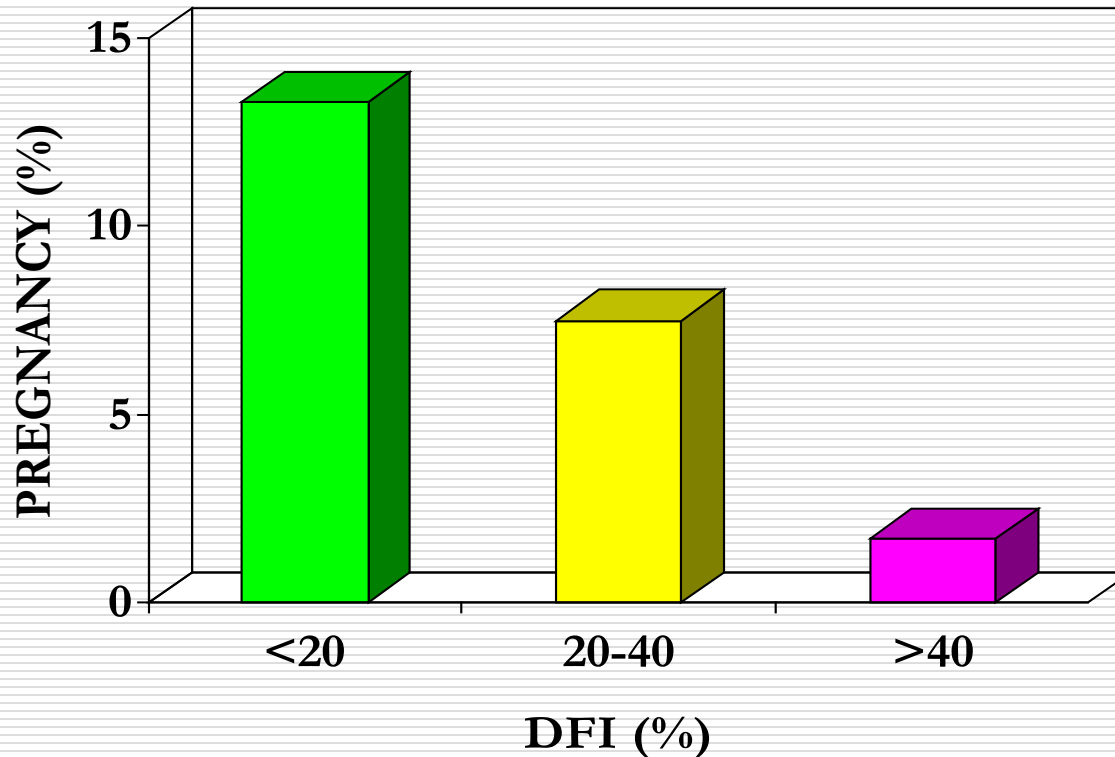
Highest DFI with pregnancy was 64.9 %

Fragmentacja DNA plemników a ciąża

□ Evenson(1999) – 165 par

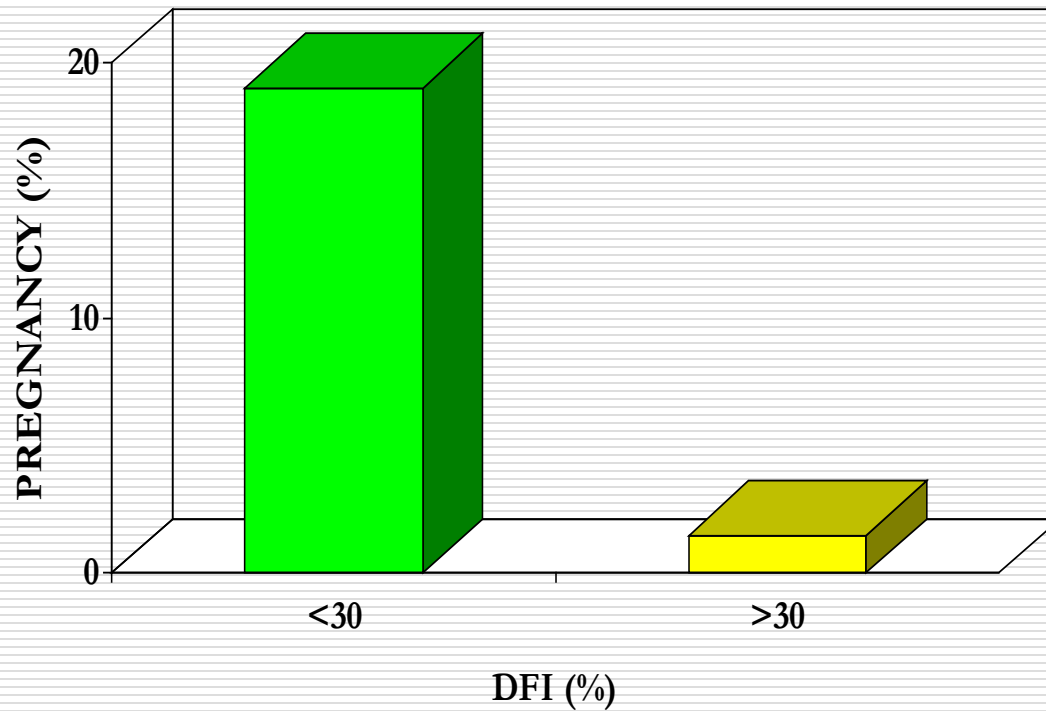
- 85% par DFI < 15% - ciąża w ciągu 3 m-cy
 - 50% par niski DFI – ciąża w ciągu 4-12 m-cy
 - DFI > 30% - czas dłuższy niż rok lub brak ciąży
-

Fragmentacja DNA plemników a ciąża (Spano, 2000; 215 par)

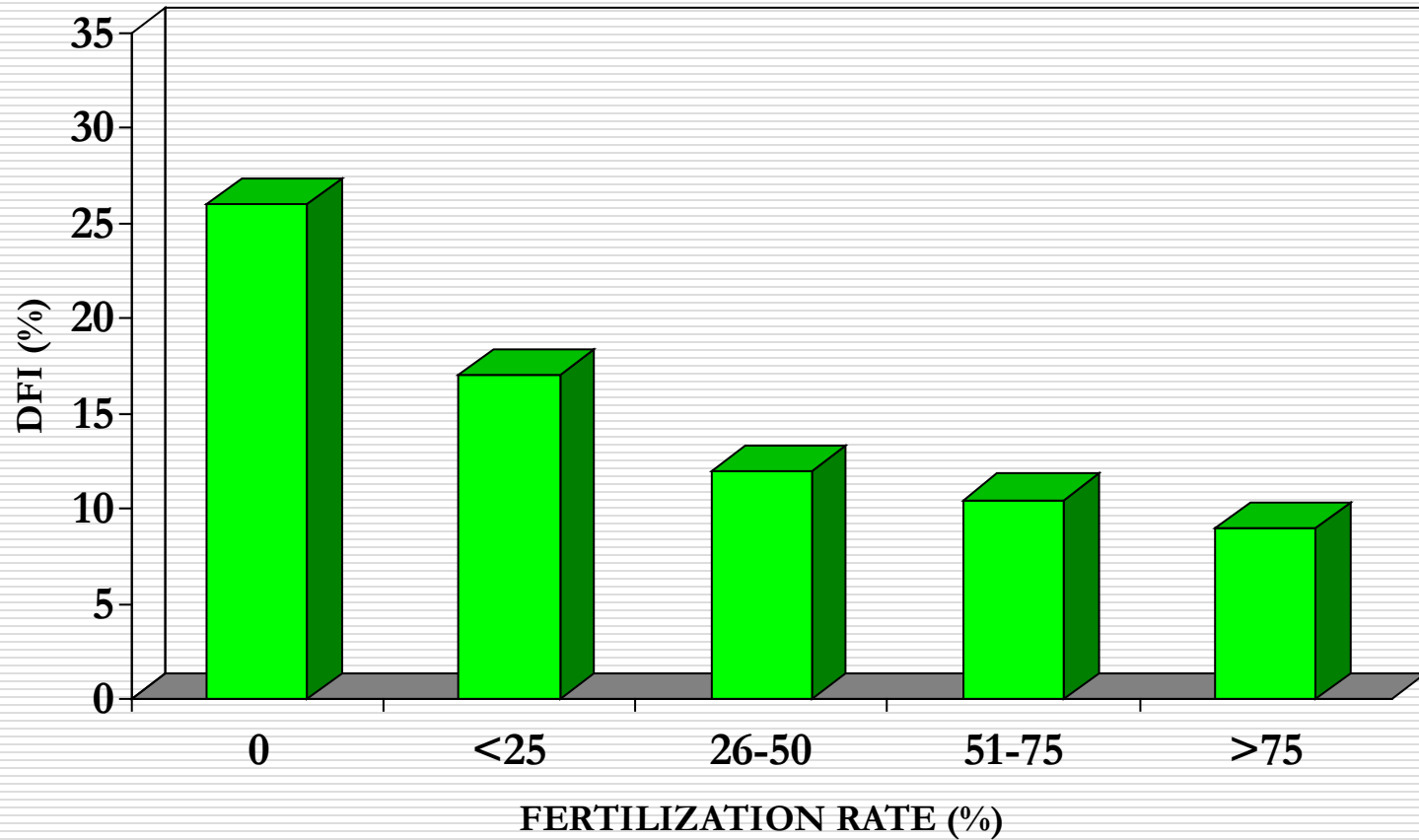


Fragmentacja DNA a skuteczność IUI

(Bungun et al., 2007, 387 cykli IUI)



Fragmentacja DNA plemników a odsetek zapłodnień po ICSI



Authors	ART	Reproductive outcome
Larson, 2000	ICSI	DNA denaturation lower in men that initiated pregnancy; no pregnancy DFI>27%
Saleh,2003	IUI,IVF, ICSI	Both fertilization and embryo development negatively related to DNA denaturation
Larson-Cook, 2003	IVF,ICSI	Sperm DNA fragmentation higher in couples with negtive pregnancy outcome
Gandini, 2004	IVF,ICSI	No corelation between SCSA parameters and fertilization and pregnancy rates
Virro, 2004	IVF,ICSI	Fertilization rate is not difrent between low and high DFI, high DFI related to low blastocyst rates
Bungum, 2004	IUI,IVF, ICSI	IUI group: higher chance of pregnancy /delivery in group with low DNA damage
Evenson, Wixon, 2006	IVF,ICSI	High sperm DNA fragmentation is predictive for reduced pregnancy success using all procedures

Ocena fragmentacji DNA jako wskaźnik powodzenia ART

- Ryzyko zatrzymania rozwoju zarodka po ICSI wzrasta gdy DFI > 15%
- Odsetek ciąż (ICSI+IVF) **35,7%** gdy DFI < 15%, **31,8%** gdy DFI > 15%
- Odsetek ciąż (ICSI) **37,4%** gdy DFI < 15%, **27,8%** gdy DFI > 15%
- Poronienia: **37,5%** gdy DFI > 15%, **8,8%** gdy DFI < 15%
 - *M. Benchabib, J. Lornage, C. Mazoyer et al.. Fert. Ster., 2007*
- Porównanie odsetka ciąży i poronień po ICSI przy odpowiednio wysokiej i niskiej fragmentacji DNA
 - 10 – 40% ciąży
 - 62,5 – 0% poronień *Borini et al., 2006*

Parameters	ICSI	
	Sperm DNA fragmentation	
	<15%	>15%
Fertilization rate (%)	75,4	70,3
Arrested development (%)	4,2	18,2
Pregnancy/transfer (%)	37,4	27,8
Pregnancy/early transfer (%)	37,6	23,1
Pregnancy/late transfer (%)	36,8	40,0
Miscarriage (%)	8,6	30,0

39% poronien występuje przy DFI>30% (*Evenson et al.*)

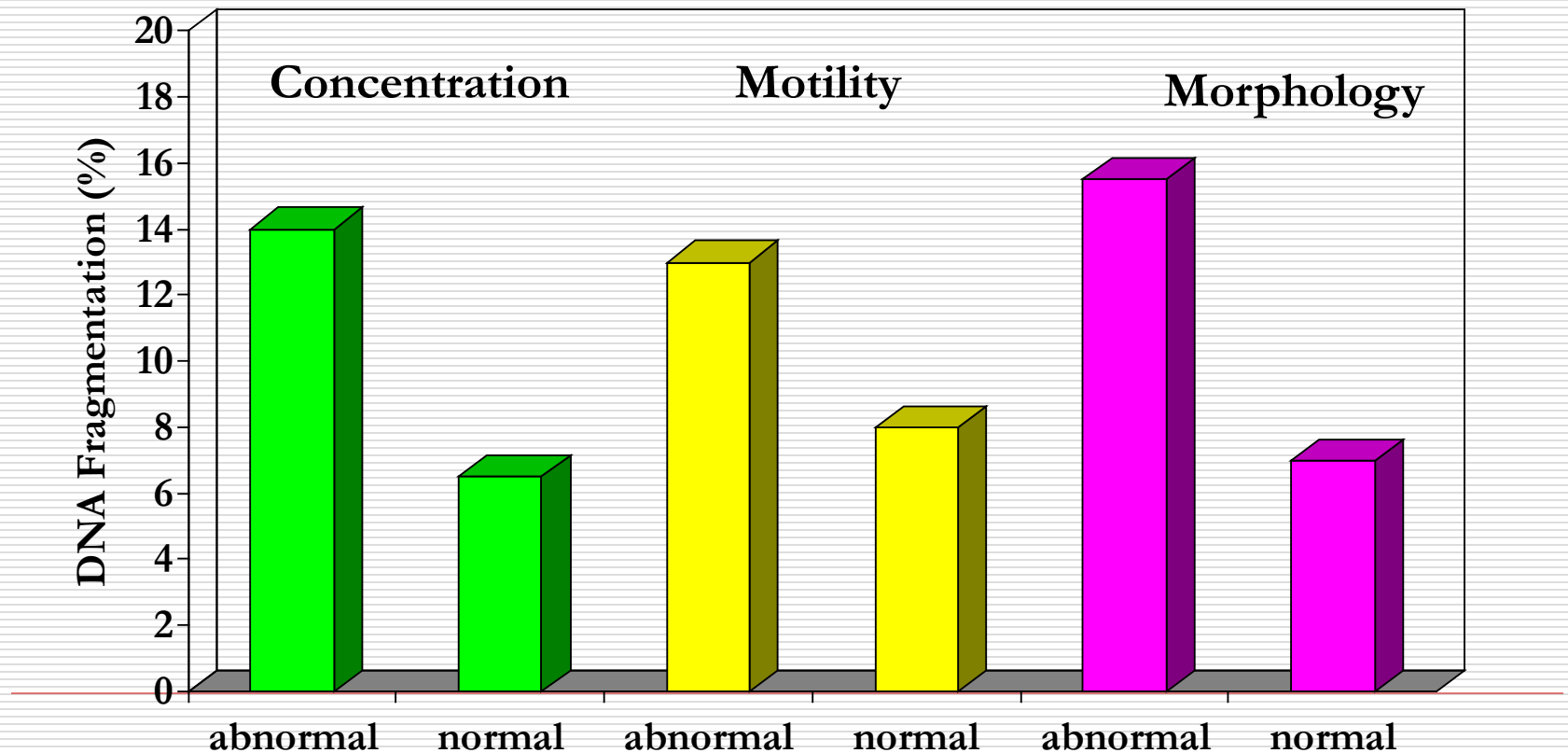
31% przypadków poronien występuje przy użyciu do ICSI

nasienia cryptozoospermicznego i OAT (*Sanchez et al.*)

- Ekspresja genów „ojca” rozpoczyna się w stadium 4-8 blastomerów
- ~~„Late paternal effect” - podczas rozwoju do blastocysty genom jest aktywowany, rozpoczyna się transkrypcja, genom „ojca” wpływa na rozwój zarodka i formowanie blastocysty (Seli et al., 2004)~~
- Korelacje między fragmentacją DNA a częstością wystąpienia poronień – blokowanie rozwoju zarodka (Borini et al., 2006)
- Duża fragmentacja DNA, nie naprawiana przez mechanizmy naprawcze oocyty, może być powodem wystąpienia mutacji genetycznych, w konsekwencji blokuje to rozwój zarodka i prowadzi do poronienia (Braude et al., 1988)

Wysoka korelacja między fragmentacją DNA a koncentracją, ruchliwością i morfologią plemników

~~Wyższa wartość prognostyczna fragmentacji DNA w porównaniu z klasycznymi parametrami nasienia~~



Kliniczne wykorzystanie SCSA w Szwecji

- U 25% mężczyzn korzystających z ART DFI > 27%
- Wysoki DFI występuje również u mężczyzn o prawidłowych parametrach nasienia
- W marcu 2007 test SCSA wprowadzono do rutynowej analizy nasienia ze wskazaniem do zabiegów ART
- W ramach publicznej opieki zdrowotnej wykonuje się IUI gdy DFI < 25%
- DFI > 25% wykonuje się ICSI
- Oczekiwania: redukcja wydatków publicznych i wzrost skuteczności leczenia par nieplodnych

Wskaźniki do wykonania SCSA

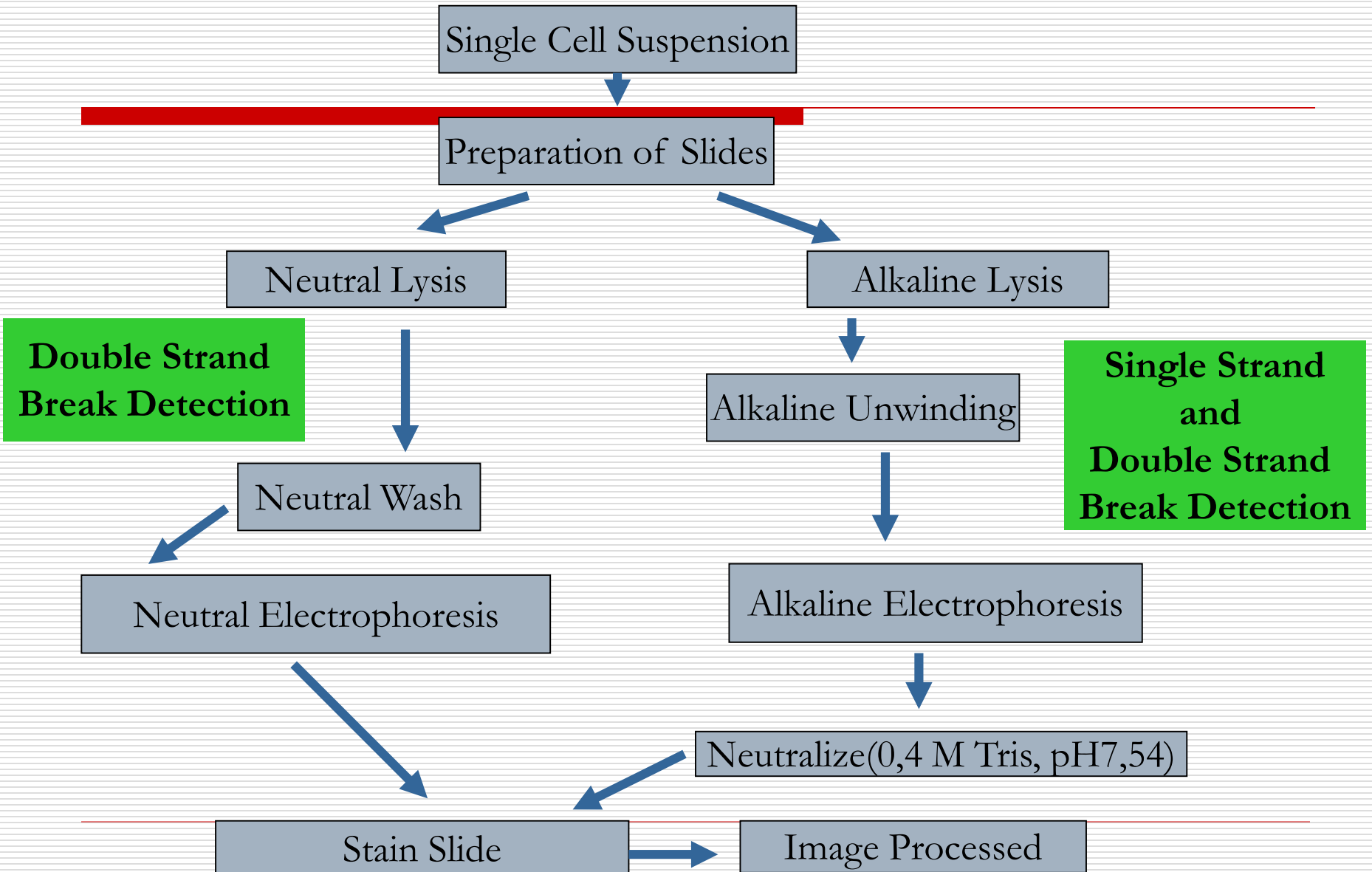
- Pary o niepłodności idiopatycznej
- Mężczyźni powyżej 40lat, nawet jeśli wcześniej mieli dzieci
- Mężczyźni narażeni na działanie substancji toksycznych
- Czynniki zwiększające ryzyko uszkodzenie DNA:
 - Palenie, leukocytospermia, żylaki powrózka, czynniki zwiększające temp w mosznie, otyłość, hiperinsulinemia, chemioterapia, radioterapia
- ~~Cryptozoospermia, oligozoospermia, oligoasthenoteratozoospermia~~

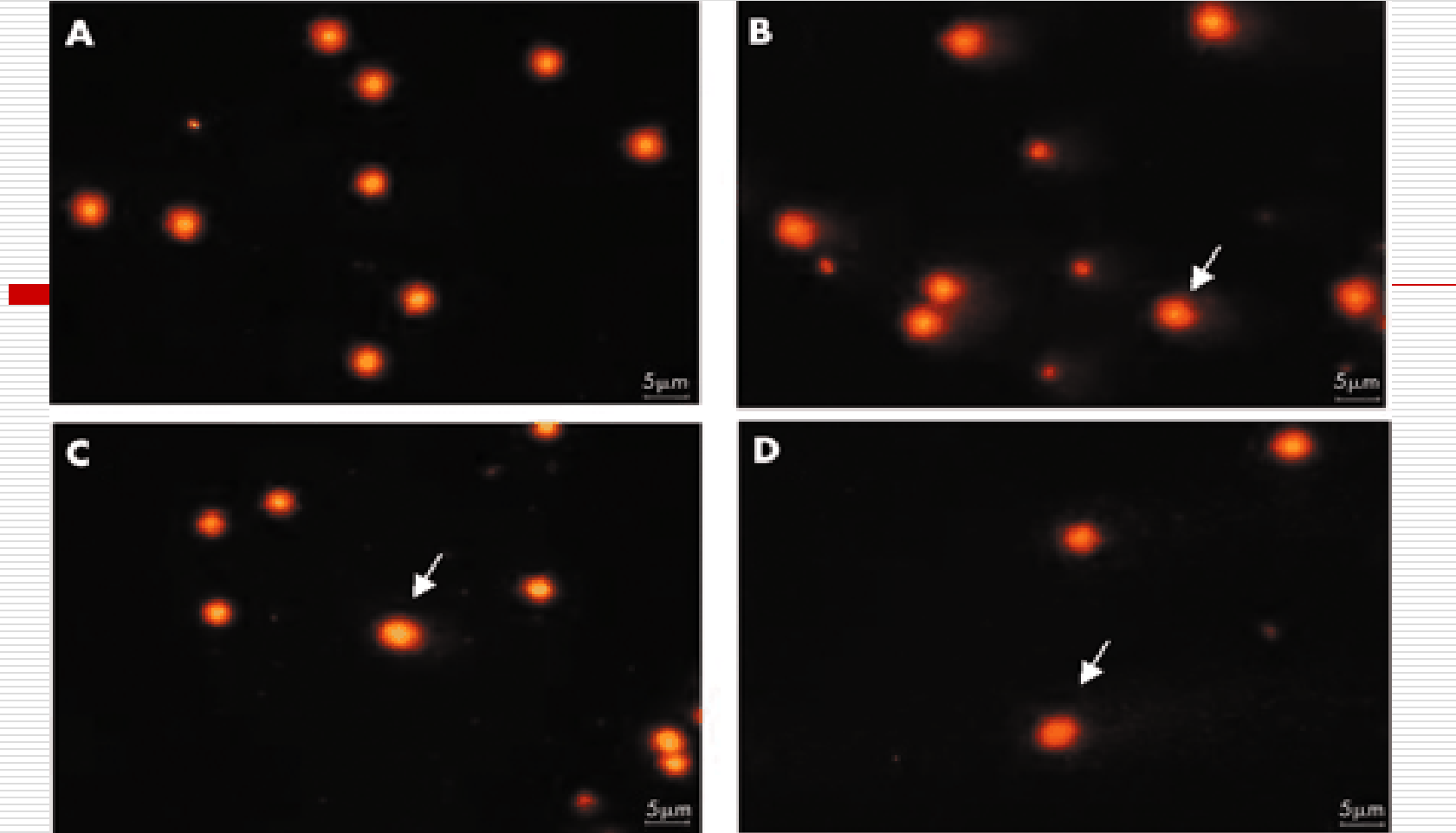
Test Comet

(SCGE - single cell gel electrophoresis)

- ❑ Wykorzystywany do badania fragmentacji DNA plemników
 - ❑ Wyniki uzyskane są skorelowane z rozwojem zarodków uzyskanych na drodze zapłodnienia *in vitro*, także z wynikami testów SCSA i TUNEL
 - ❑ Do oceny wyników stosuje się mikroskop fluorescencyjny; wymaga doświadczenia na etapie analizy i interpretacji wyników
-
- ❑ **Możliwość analizy komputerowej**

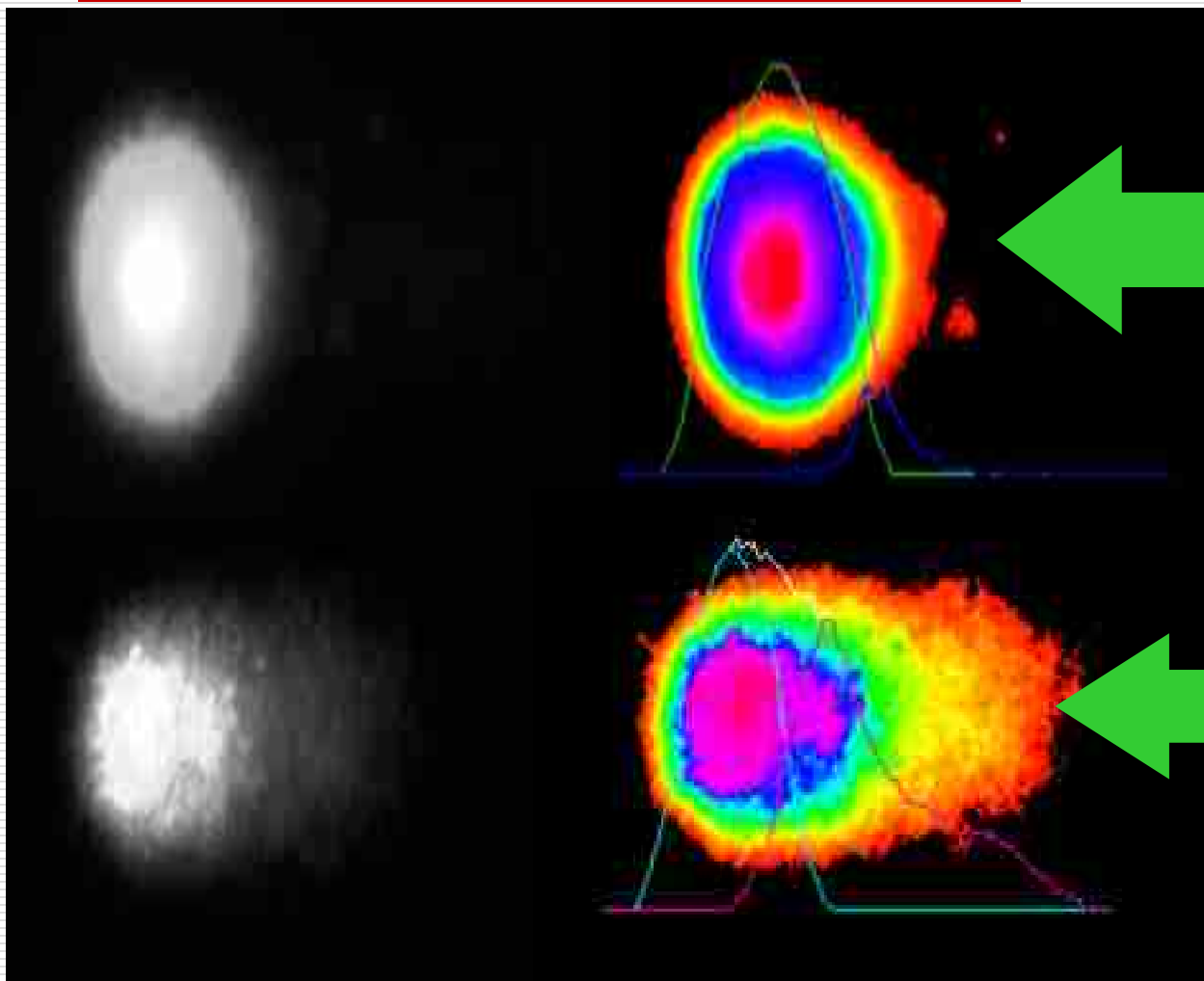
Test Comet cd.





Ryc. W przypadku występowania uszkodzeń DNA zaobserwować można obraz przypominający kometę. Głowę komety stanowi obszar jądra komórkowego, natomiast ogon fragmenty DNA, które wyemigrowały podczas elektroforezy. Im większe uszkodzenia tym ogon jest dłuższy i zawiera więcej DNA. (A) Grupa kontrolna: plemniki o nieuszkodzonym DNA. (B) Plemniki o niskiej fragmentacji DNA. (C) Plemniki o średniej fragmentacji DNA. (D) Plemniki o największej fragmentacji DNA.

Test Comet cd.



Obraz DNA:
komórki kontrolne
9% DNA w ogonie
(lewa strona widok
rzeczywisty,
prawa z oprogramowania
do analizy)

Obraz DNA:
50% DNA w ogonie

DNA Break Detection Fluorescent *in situ* Hybridization test (DBD FISH)

- ❑ **Test ocenia obecność złamań w łańcuchu DNA pojedynczych komórek utrwalonych w agarozie**
 - ❑ **Po odrzuceniu nukleoprotein stosuje się bufor alkaliczny do rozplecenia podwójnej nici DNA w miejscach obecności złamań w łańcuchu DNA**
 - ❑ **Złamania w pojedynczej nici DNA wizualizuje się wyznakowaną fluorescencyjnie sondą genomową**
-

SCD

application



keep dry

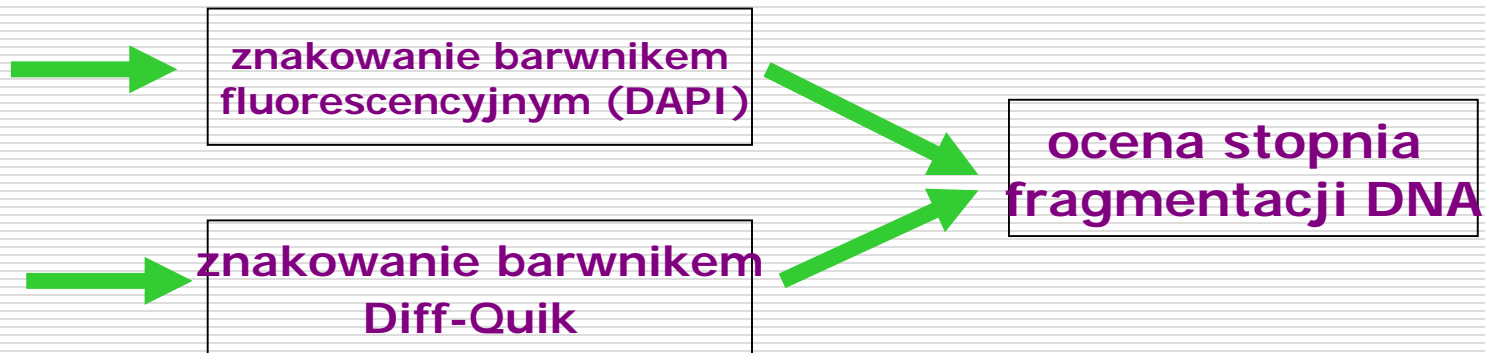
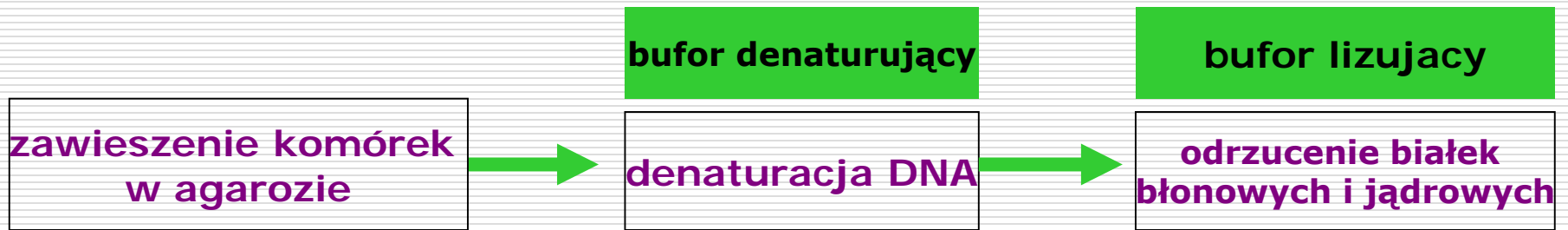
Halosperm® Kit from Halotech Dna, SL is a simple test that allows assessment of sperm DNA fragmentation in humans.

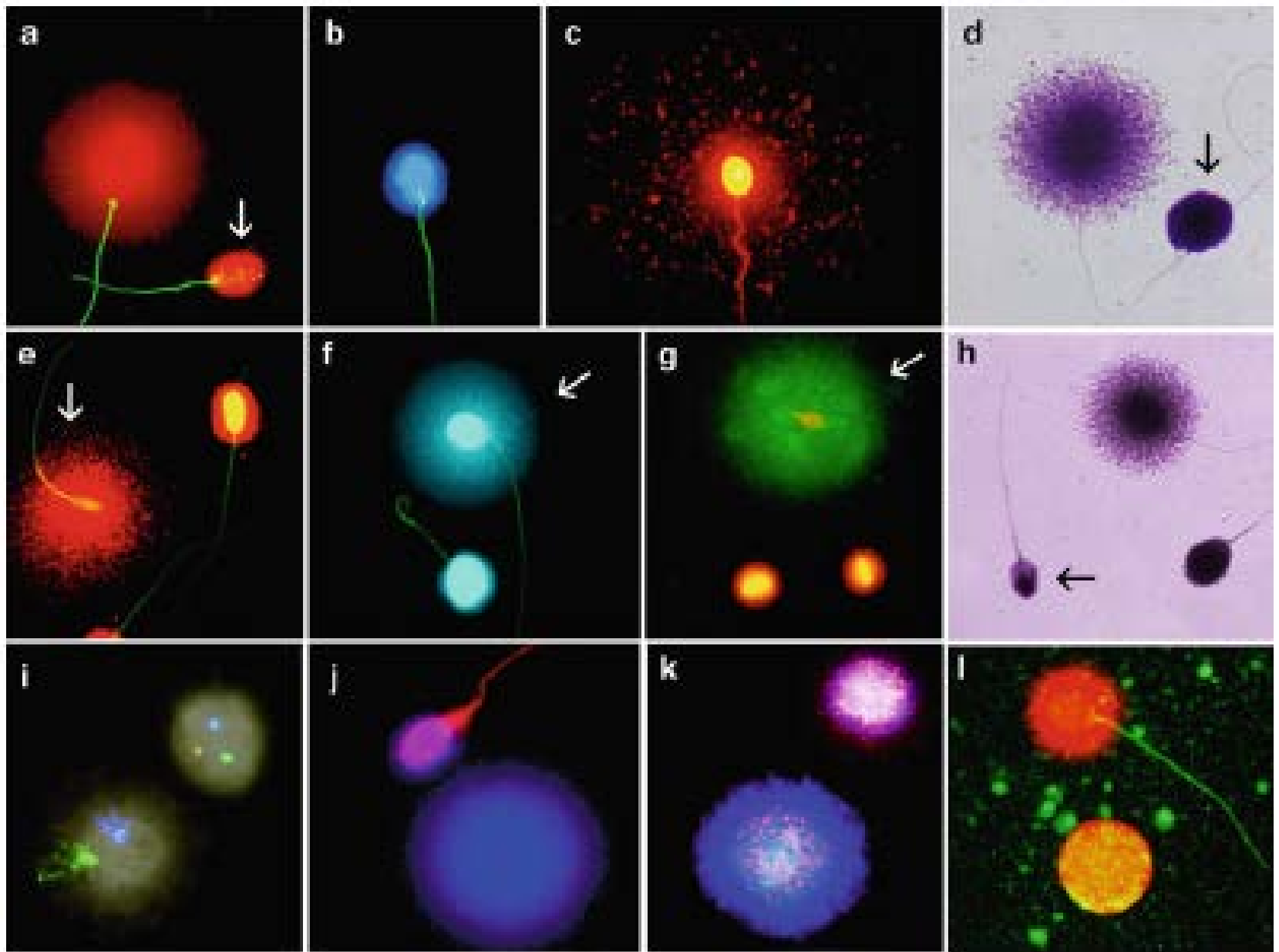
Principle of the method:

The method is based on the Sperm Chromatin Dispersion (SCD) test (Fernández et al., J. Androl 24: 59-66, 2003; Fertil Steril 84: 833-842, 2005). Intact unfixed spermatozoa (fresh, frozen/unthawed, diluted samples) are immersed in an inert agarose microgel on a pretreated slide. An initial acid treatment denatures DNA in those sperm cells with fragmented DNA. Following this, the lysing solution removes most of the nuclear proteins, and in the absence of massive DNA breakage produces nucleoids with large halos of spreading DNA loops, emerging from a central core. However, the nucleoids from spermatozoa with fragmented DNA either do not show a dispersion halo or the halo is minimal.

Test SCD

(Sperm Chromatin Dispersion)





sperm classification

Removal of sperm nuclear proteins results in nucleoids with a central core and a peripheral halo of dispersed DNA loops. The sperm tails remain preserved. For sperm classification we must take into account that sperm DNA fragmentation is a continuous process which produces a series of different halo sizes. Initially, the study of a minimum of 500 spermatozoa per sample is recommended, adopting the criteria of Fernández et al. (Fertil Steril 84: 833-842, 2005). Avoid scoring cells close to the edge of the microgel. Classification:

- **Spermatozoa without dna fragmentation:**

- **spermatozoa with big halo:** those whose halo width is similar or higher than the minor diameter of the core (Figure 1).
- **spermatozoa with medium-sized halo:** their halo size is between those with large and with very small halo (Figure 2).

- **Spermatozoa with fragmented dna:**

- **spermatozoa with small halo:** the halo width is similar or smaller than 1/3 of the minor diameter of the core (Figure 3).
- **spermatozoa without halo:** (Figure 4).
- **spermatozoa without halo and degraded:** those that show no halo and present a core irregularly or weakly stained (Figure 5).
- **“others”:** cell nuclei which do not correspond to spermatozoa. One of the morphological characteristics which distinguish them is the absence of tail.

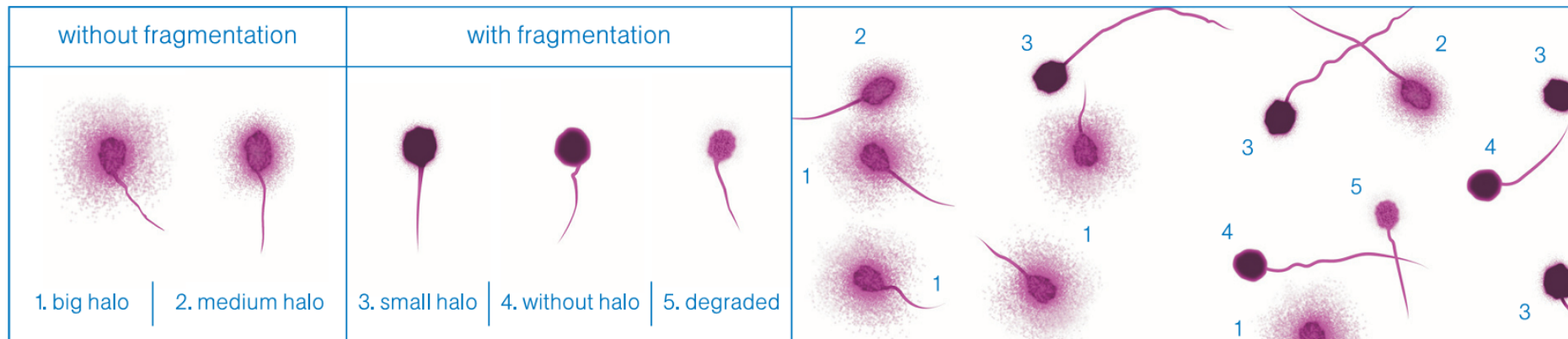
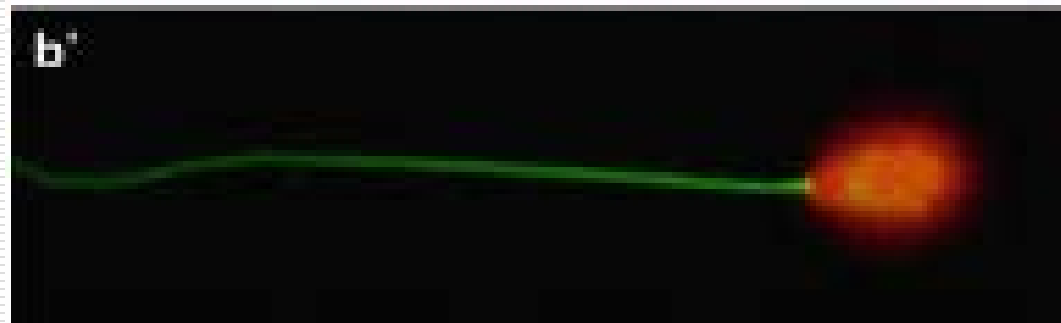
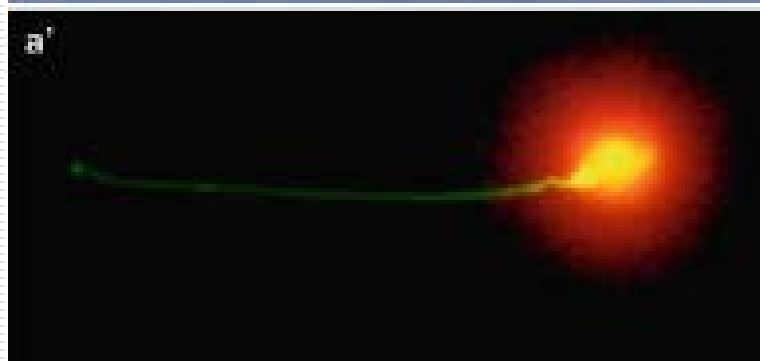
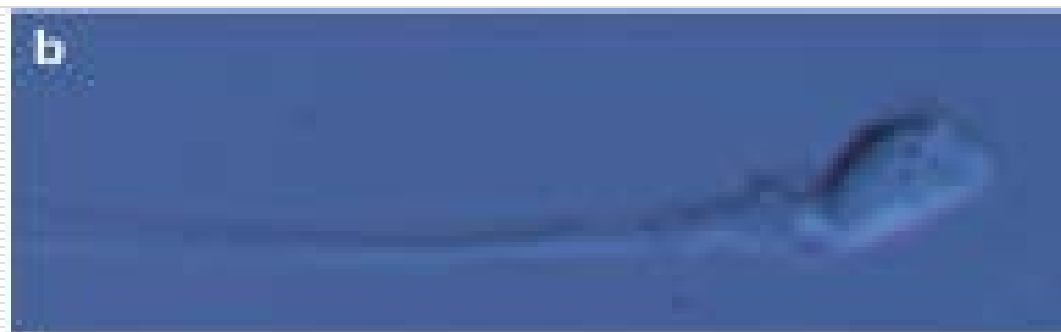
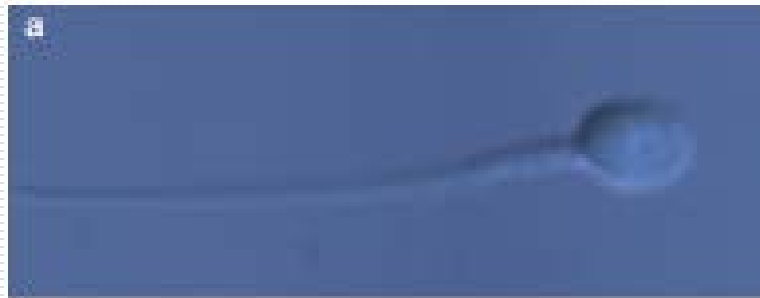
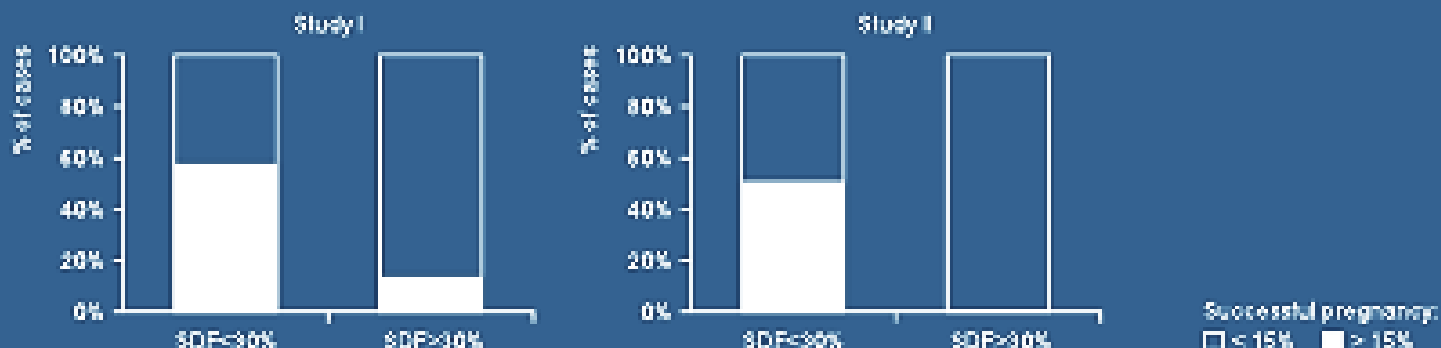


Fig. 10.3 High magnification selected sperm (**a**, **b**) and the characterization of SDF in the same sperm (**a'**, **b'**). The SCD test allows the direct assessment of the DNA status and the sperm morphology



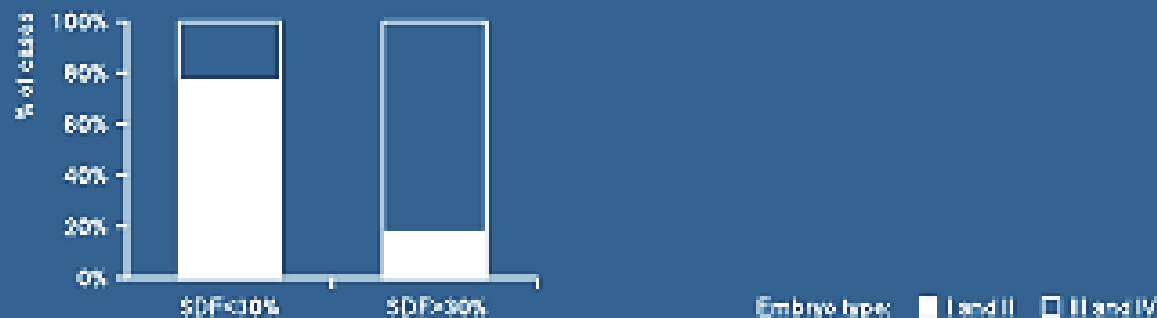
Two independent ongoing studies^{A, F} have shown that when performing Intra-Uterine Injection (IUI), the probability of a successful outcome of pregnancy is significantly higher when using sperm samples with a mean fragmentation index below 30% than using those with a mean fragmentation index above 30%:

Influence of mean DNA fragmentation index on successful pregnancy outcome using IUI:



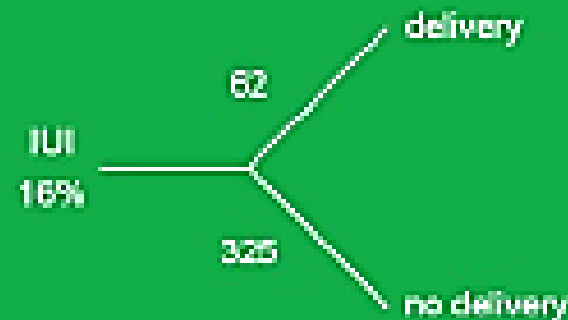
In addition, the same study^F has demonstrated that embryo quality is better when using semen samples with lower mean fragmentation levels with In Vitro Fertilization (IVF):

Influence of mean DNA fragmentation index on embryo quality using IVF:



WITHOUT MEASURING SDF

TOTAL DELIVERIES = 62



MEASURING SDF

TOTAL DELIVERIES = 78

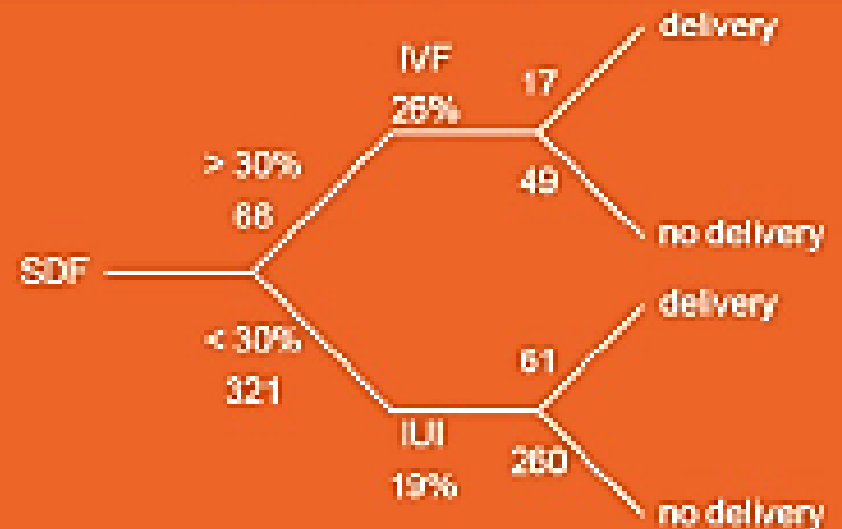
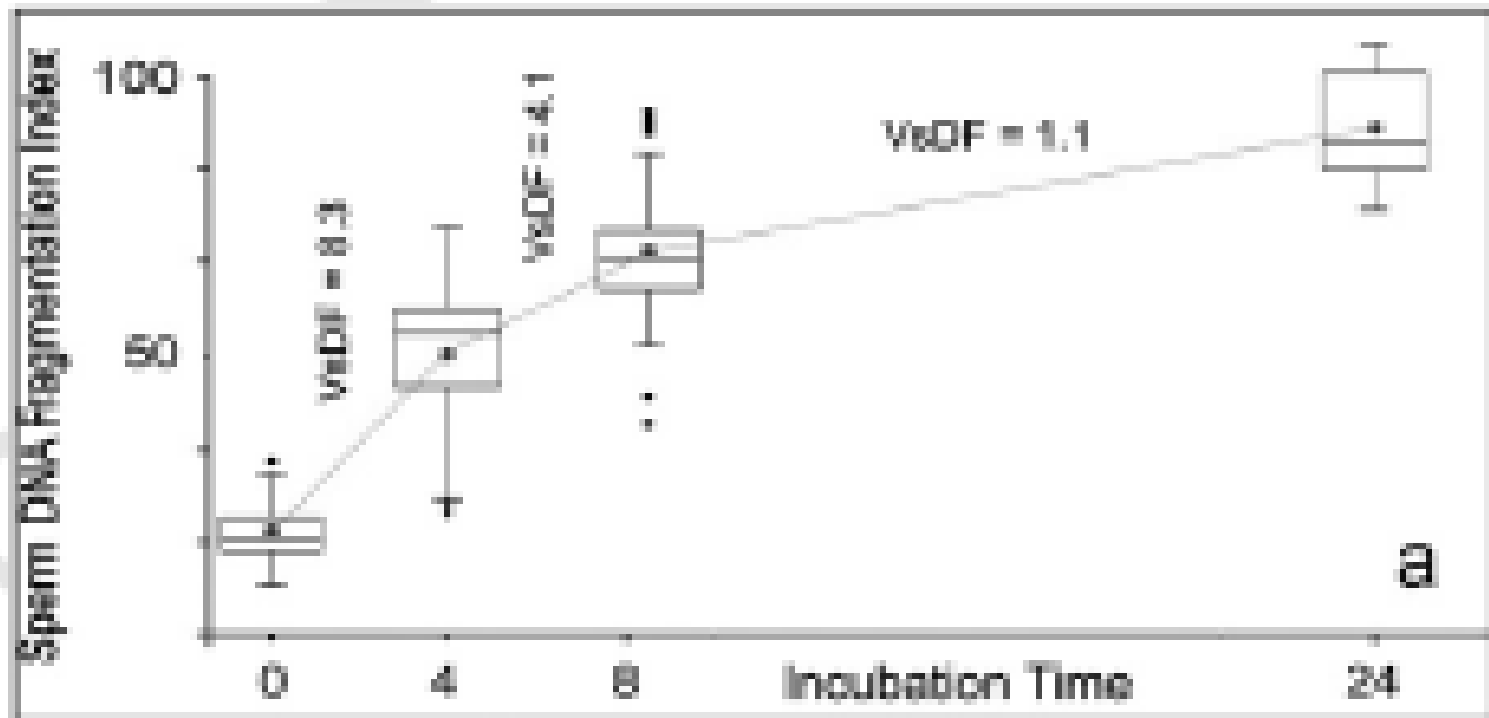


Fig. 10.4 Number of deliveries after the first cycle, taking into account SDF in the choice of assisted reproduction technique. Selecting IUI for all patients (*left panel*) yields a total of 62 live births, whereas only

subjecting couples with high SDF to IVF and couples with low SDF to IUI (*right panel*) yields a total of 78 live births (adapted from Bungum et al. [63], with permission)

(a) Box-and-whisker plots for the sperm DNA fragmentation index observed at different incubation times (37°C) for spermatozoa and the rate for sperm DNA fragmentation observed at each interval. (b)

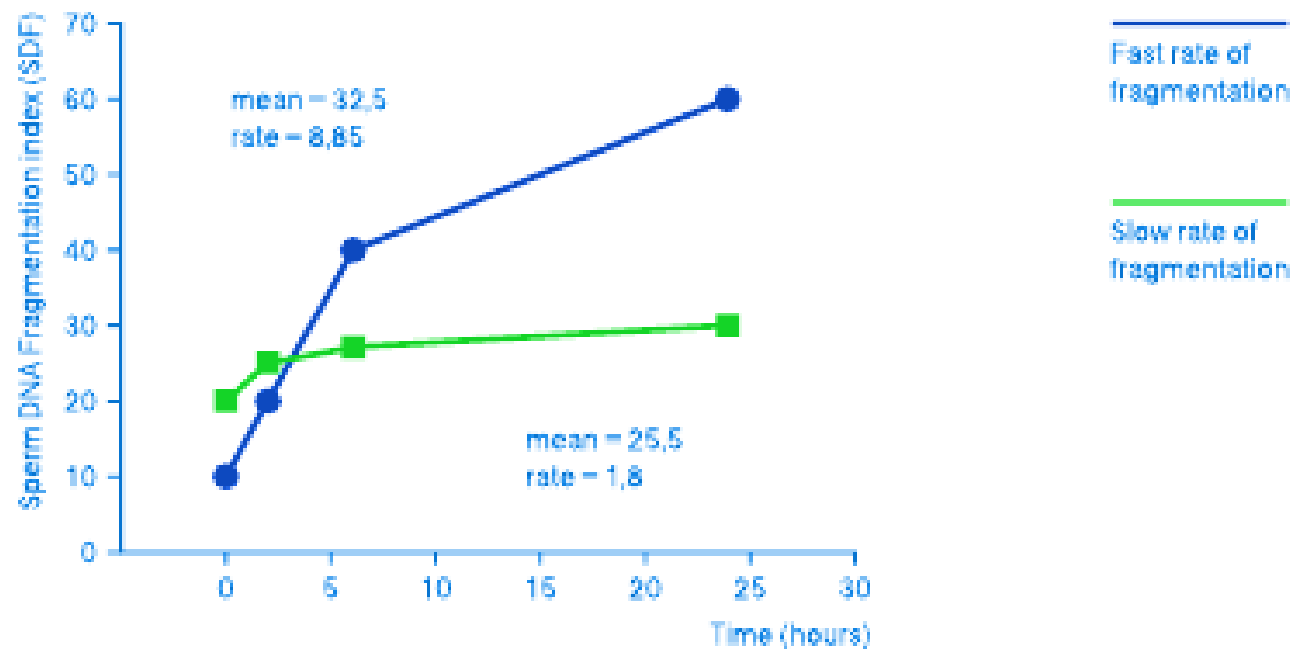


Dyn-Halosperm® distinguishes between fragmented and non-fragmented DNA in sperm cells and allows the calculation of the Sperm DNA Fragmentation Index (SDF), i.e. the percentage of spermatozoa with fragmented DNA. In addition, using the Dyn-Halosperm® kit it is possible to study sperm DNA fragmentation over four different time points.

Sperm DNA fragmentation is related to fertilization rate¹, embryo quality¹, embryo development and male pathologies (such as varicocele² or infections by *Chlamydia trachomatis*³).

Each individual has a unique dynamic profile of sperm DNA fragmentation⁴.

Sperm DNA Fragmentation index (SDF):



Information provided by Dyn-Halosperm*

The Dyn-Halosperm* protocol provides the following information about DNA fragmentation for a given semen sample:

1. Basal fragmentation level.
2. Rate of change.
3. Mean.

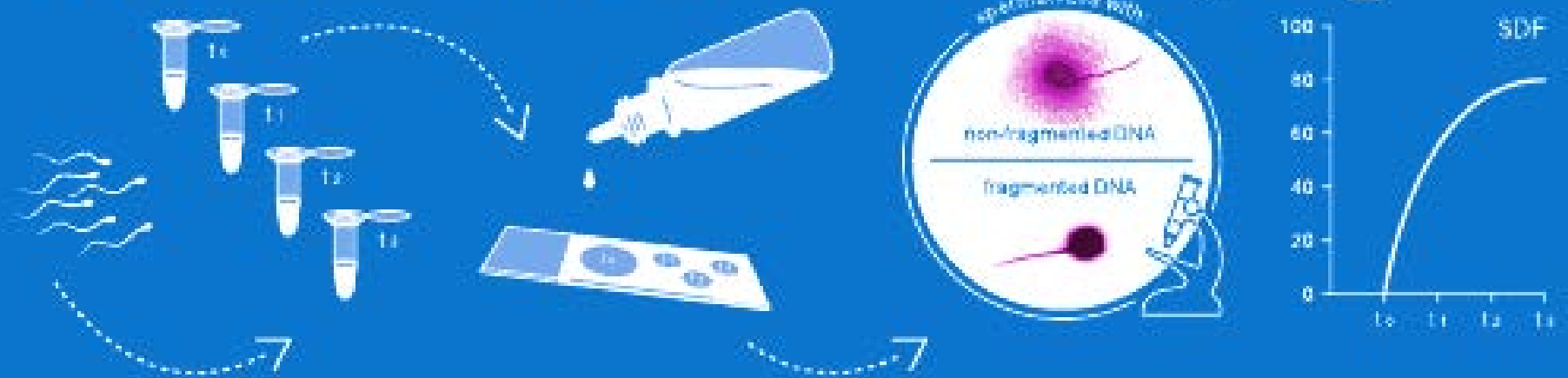
Clinical applications based on basal fragmentation and rate of change

Knowing the evolution of sperm DNA fragmentation over time allows clinicians to:

1. Select the optimum moment to carry out an ART cycle.
 2. Select the type of assisted reproduction technique: if the rate of DNA fragmentation is high then it is advisable to use techniques that assure a quick fertilization of the oocyte.
 3. Assess the quality of semen samples or donors for suitability.
 4. Provide answers to cases of unexplained infertility, ART failure or repeated abortions.
-

sample processing

The dynamic profile of DNA fragmentation is obtained in four easy steps:



1. Aliquoting the semen samples in 4 eppendorf tubes corresponding to each time point

2. Processing and staining of the 4 aliquots simultaneously on a single slide using the kit reagents

3. Visualization of the results using bright field or fluorescence microscopy

4. Analysis of the results

Apoptoza - definicja

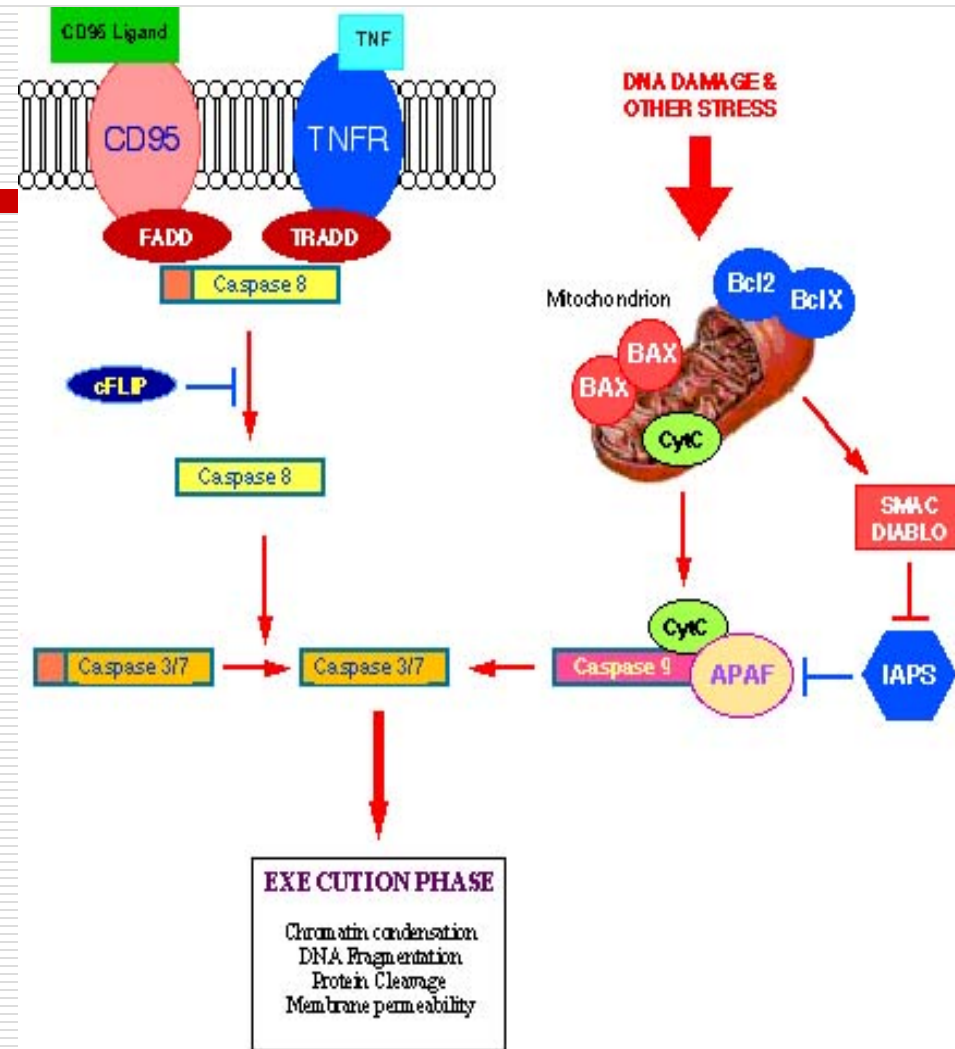
Apoptoza lub programowana śmierć komórki jest uporządkowanym, czynnym procesem przebiegającym z aktywacją wielu swoistych szlaków biochemicznych, wymagającym syntezy nowych białek, zależnym od cząsteczek sygnalizacyjnych, lub wywołanym przez czynniki uszkodzające komórkę

Apoptoza

- Zmiany w jądrze komórkowym mają charakter zorganizowany- chromatyna ulega kondensacji a DNA zostaje pocięte przez endonukleazy
 - Następuje dezintegracja cytoszkieletu
 - Błona komórkowa nie zostaje przerwana
 - Organelle komórkowe pozostają nienaruszone, usuwane są z komórki wraz z fragmentami chromatyny w tzw. ciałkach apoptycznych. W większości przypadków są one następnie fagocytowane przez komórki żerne
-
- Apoptoza nie wywołuje stanu zapalnego

Apoptoza

- W procesie apoptozy udział biorą enzymy z rodziny ICE (interleukin -1-beta-converting enzyme) nazywane kaspazami. Występują one w komórce jako proenzymy, aktywujące się wzajemnie oraz aktywujące inne enzymy, co prowadzi do uszkodzenia białek cytoszkieletu, enzymów jądrowych oraz do cięcia DNA
- Aktywacja kaspaz zależna jest od białek z rodziny Bcl-2. W ich skład wchodzi zarówno enzymy aktywujące jak i hamujące działanie kaspaz. Równowaga między tymi grupami białek decyduje o apoptozie



Apoptoza plemników

- Apoptoza w nabłonku plemnikotwórczym kontroluje i ogranicza nadmierną produkcję spermatogonii
- Pozwala na ustalenie odpowiedniej liczby komórek podlegających podziałom i różnicowaniu oraz eliminuje uszkodzone komórki pojawiające się podczas regularnej spermatogenezy
- Nasiloną apoptozą może być wynikiem zaburzeń kontroli i regulacji tego procesu lub nieprawidłowości spermatogenezy

„Abortive apoptosis”

- Apoptoza plemników nie jest procesem całkowicie skutecznym – plemniki w ejakulacie mogą wykazywać molekularne i morfologiczne cechy komórek apoptotycznych
 - Uwalnianie z gonady komórek apoptotycznych i ciałek apoptotycznych niefagocytowanych przez komórki Sertoliego może wynikać z braku synchronizacji spermatogenezy i apoptozy
-

Apoptoza plemników

??
????????????????????????????????

- ❑ Apoptoza nie jest inicjowana w dojrzałych plemnikach
 - ❑ Obniżenie ruchliwości plemników podczas przechowywania ejakulatu wynika z przebiegu nekrozy
 - ❑ Nie znany jest mechanizm inicjacji apoptozy
-

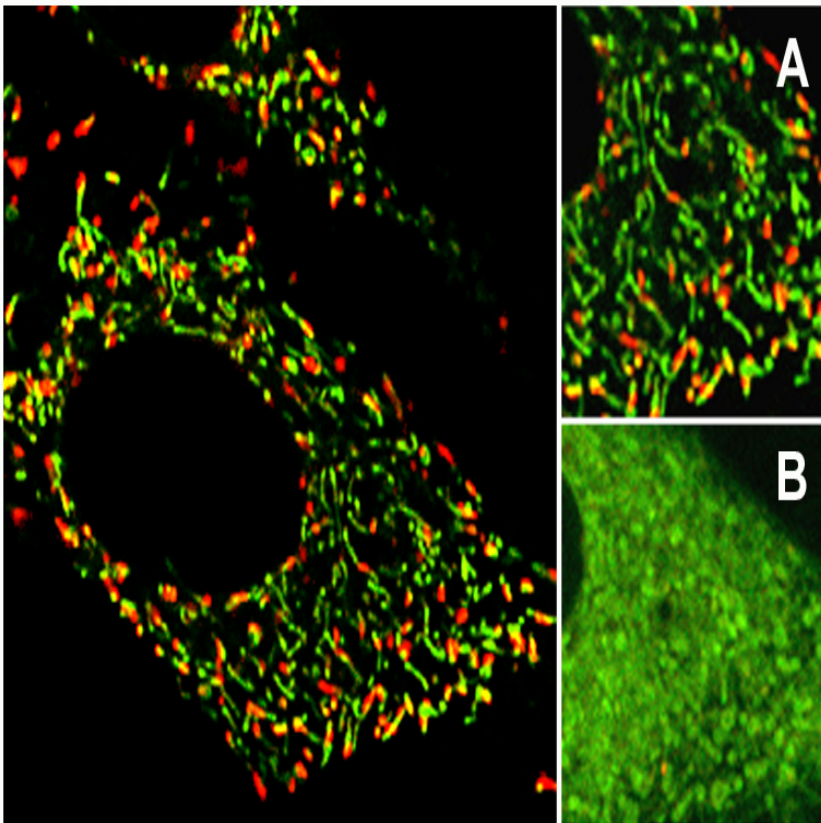
Błonowy potencjał mitochondrialny

- We wczesnym etapie apoptozy komórki dochodzi do gwałtownego spadku potencjału błonowego mitochondriów**
 - Spadek potencjału poprzedza wzrost przepuszczalności błony mitochondrialnej**
 - Potencjał mitochondrialny może być wskaźnikiem zdolności plemników do zapłodnienia**
 - Wysoki potencjał skorelowany jest z prawidłową ruchliwością, morfologią i zdolnością do przejścia reakcji akrosomowej**
-

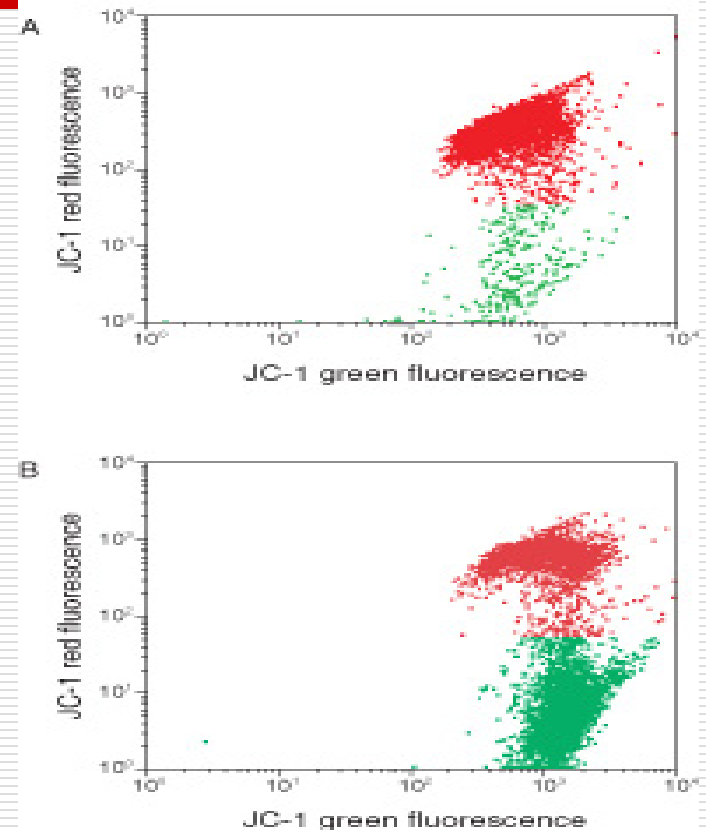
Błonowy potencjał mitochondrialny

- **JC-1 (5,5' ,6,6' –tetrachloro-1,1' ,3,3' tetraethylbenzimidazolylcarbocy-anine chloride) wybarwia mitochondria żywych komórek zależnie od ich potencjału błonowego:**
 - monomer JC-1 emituje zieloną fluorescencję ($\lambda_{em}=527nm$)
 - J-agregaty emitują czerwoną fluorescencję ($\lambda_{em}=590nm$)
- **Wysoki potencjał błonowy promuje formowanie agregatów barwnika (fluorescencja czerwona), obniżenie potencjału powoduje rozpad agregatów do formy monomerowej (fluorescencje zielona)**

JC - 1



- Ryc. Mitochondria barwione JC-1
- A: stan podstawowy komórek
- B: indukowany spadek potencjału mitochondrialnego



- Ryc. Cytogram. Barwienie JC-1

