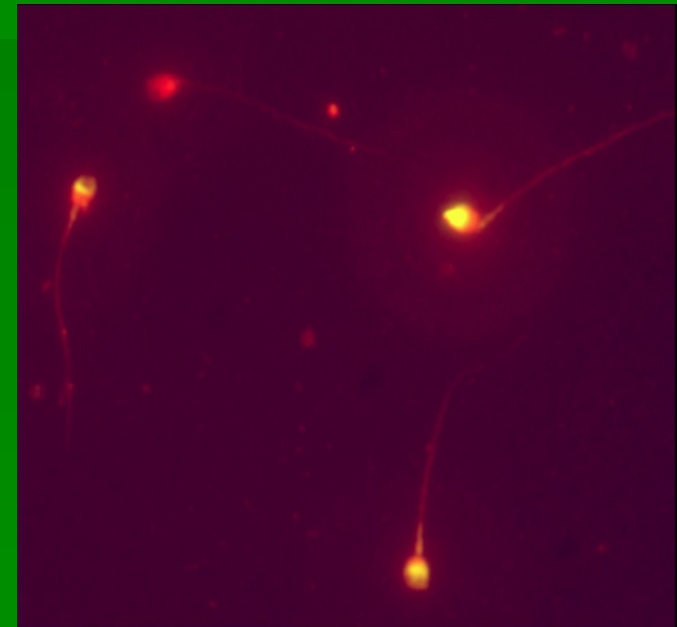


Клиническое значение исследования фрагментации ДНК сперматозоидов

Марцинко О.Б.
Стрелко Г.В.,
Бутенко Ю.Г.,
Клиника генетики
репродукции «ВИКТОРИЯ»

г. Киев, 2009 г.



Апоптоз, или запрограммированная гибель клетки, представляет собой процесс, посредством которого внутренние или внешние факторы, активируя генетическую программу, приводят к гибели клетки.

Апоптоз – это биохимически специфический тип гибели клетки, который характеризуется активацией нелизосомных эндогенных эндонуклеаз, которые **расщепляют ядерную ДНК на маленькие фрагменты.**

Биологическое значение апоптоза

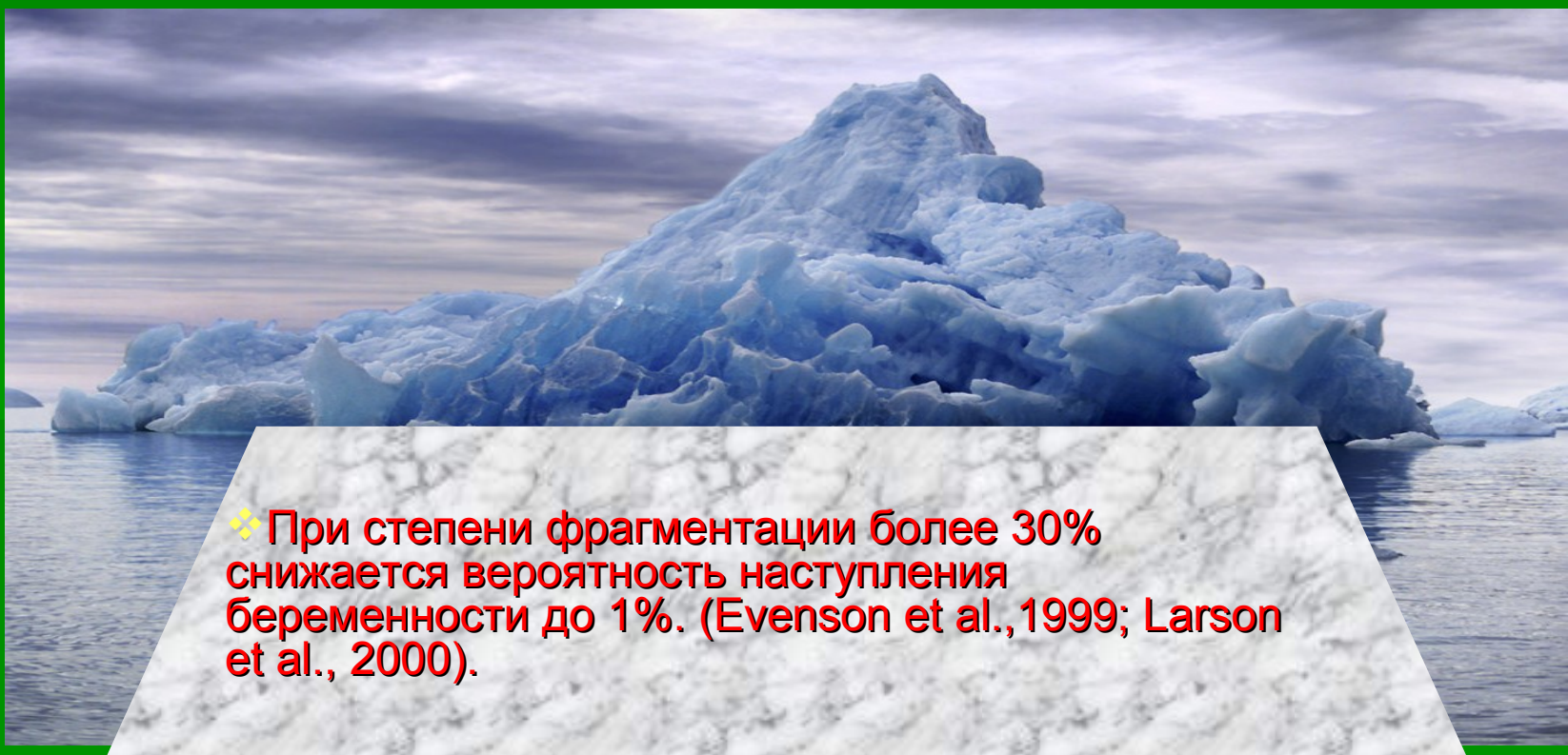
- ❖ Удаление дефектных клеток организма.
 - ❖ Поддержание гомеостаза.
 - ❖ Контроль размера органов.
 - ❖ Развитие эмбриона.
- Из всех формирующихся сперматозоидов **более 75%** останавливаются в развитии благодаря апоптозу. Сперматозоиды, в которых был запущен этот механизм, но не был до конца завершен (неполный апоптоз, или абортивный апоптоз), могут иметь нарушения целостности ДНК (Singh N.P., 1999; Sakkas D. 2003)

Влияние на фертильность

- У бесплодных мужчин процент сперматозоидов с нарушением целостности ДНК 25 – 30% и более (Spano M., 2000)
- У фертильных мужчин – до 10 – 13 % (Ahmadi A., 1999)
- Была найдена корреляция между спонтанным прерыванием беременности и увеличением процента сперматозоидов с нарушением целостности ДНК (Carrel D.T., 2003)



Порог – степень фрагментации более 30%

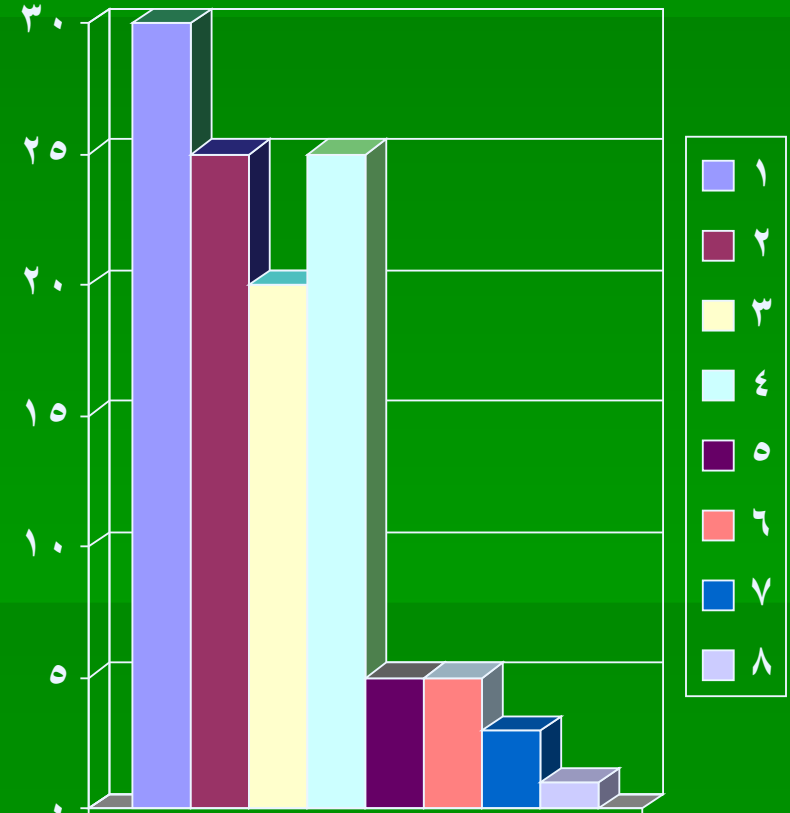


❖ При степени фрагментации более 30% снижается вероятность наступления беременности до 1%. (Evenson et al., 1999; Larson et al., 2000).

Выявление

- Мужской ф-р 30%
- Нарушение овуляции 25 %
- Трубный фактор 20%
- Бесплодие неясного генеза 25%
- Эндометриоз 5%
- Эякуляторная дисфункция 5%
- Шеечный фактор 3%
- Анатомические аномалии матки <1%

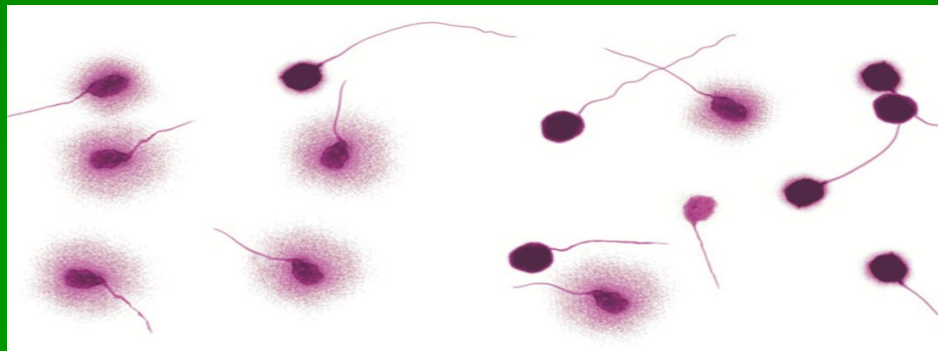
15% пар имеют больше 1 причины бесплодия



Фрагментация ДНК

Клинические проявления:

бесплодие в браке неясной этиологии (Evenson et al., 1999; Larson et al., 2000), с/а, низкое качество эмбрионов, снижение частоты наступления беременности в программах ВРТ (Genesca et al, 1992; Parinaud et al, 1993; Twigg et al, 1998; Evenson et al, 1999).



Причины апоптоза

Внешние

- ϒ. Агрессивные химические среды
- ϛ. Ионизирующее излучение
- Ϝ. Заражение вирусами
- ⓪. Локальная гипертермия (пр. варикоцеле)
- Ϛ. Курение
- ϛ. Экологическая обстановка

Внутренние

- ⓐ. Генетический аппарат



Технология исследования

- ❖ Основа технологии- отличный ответ, ядер сперматозоидов с фрагментированной ДНК по сравнению с другими сперматозоидами.
- ❖ Контролируемая денатурация ДНК, сопровождается удалением ядерных белков.
- ❖ Петли ДНК расширяются, формируя ореол дисперсии хроматина.
- ❖ Ядро сперматозоидов с фрагментированной ДНК не развивает ореол дисперсии или ореол минимален.

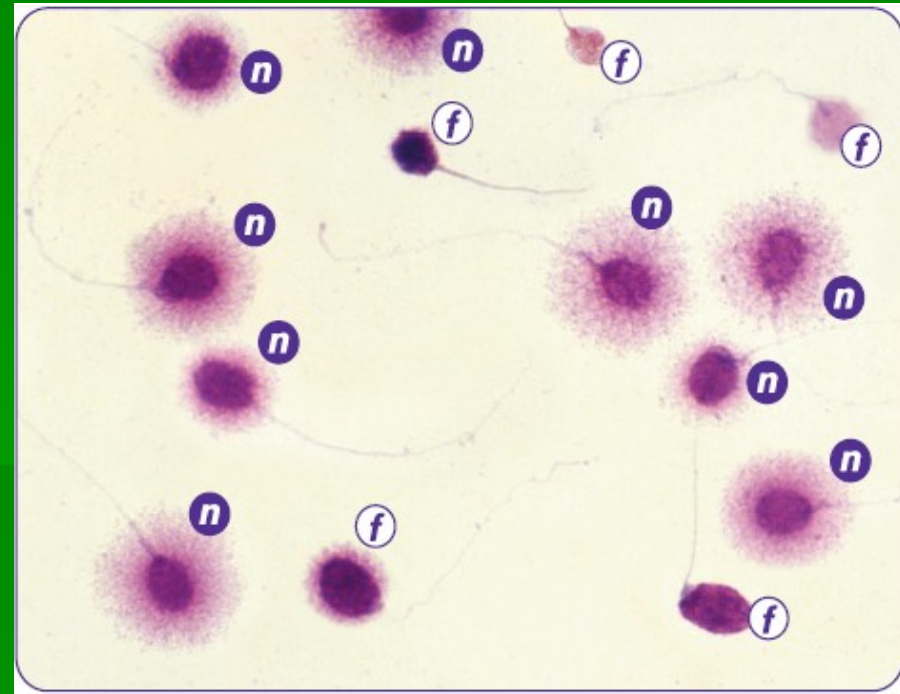
Признаки апоптоза

- ❖ Изменения клеточной мембраны.
- ❖ Распад клеточного ядра.
- ❖ Уплотнение хроматина.
- ❖ Фрагментация ДНК.
- ❖ Фрагментация клеток.

Критерии оценки степени фрагментации ДНК сперматозоидов

F – сперматозоид с фрагментированной ДНК

N – нормальный сперматозоид

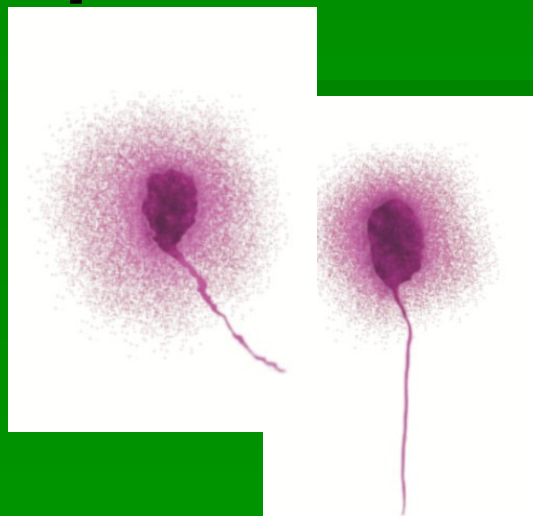


Критерии оценки степени фрагментации ДНК сперматозоидов

❖ СПЕРМАТОЗОИДЫ БЕЗ ФРАГМЕНТАЦИИ ДНК

- Сперматозоиды с большим ореолом, где толщина ореола равна, или больше диаметра ядра.

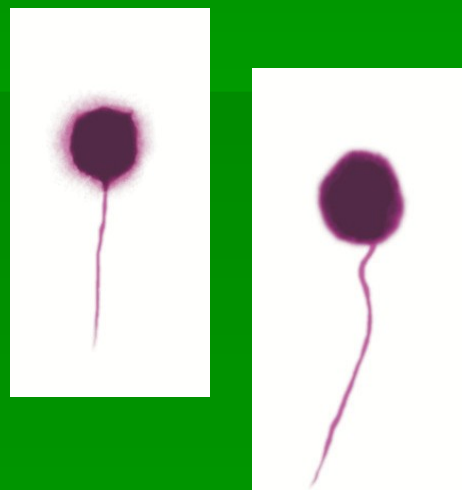
- Сперматозоиды с ореолом среднего размера, где толщина ореола должна быть больше $1/3$ диаметра ядра.



❖ СПЕРМАТОЗОИДЫ С ФРАГМЕНТАЦИЕЙ ДНК

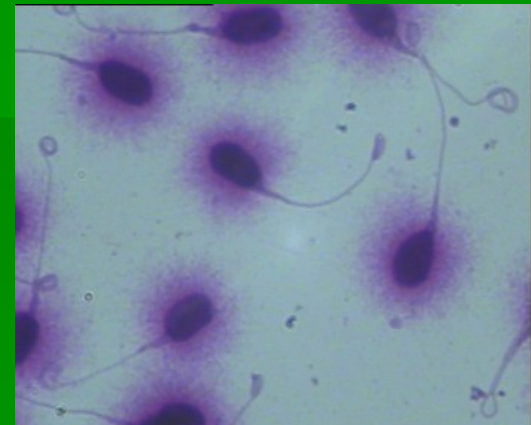
- Сперматозоиды с маленьким ореолом: толщина ореола равна или меньше, чем $1/3$ диаметра ядра.

- Сперматозоиды без ореола.



Визуализацию ядер сперматозоидов произвели:

- ❖ На микроскопе Zeiss Axio Imager M-1 с использованием иммерсионного объектива флюоресцентного микроскопа при увеличении $\times 100$
- ❖ Подсчет - 500 сперматозоидов в исследуемом образце



Цель исследования:

- ❖ Выявить степень фрагментации ДНК в сперматозоидах различных образцов эякулята а также взаимосвязь с эмбриологическими показателями: оплодотворение, дробление, способность к формированию бластоцист, наступление беременности.

Материалы и методы

**В анализ вошли
32 образца
эякулята
пациентов
после
неудачных
программ ВРТ
(ICSI)**



Неудачные попытки ICSI:

- 81,3 % – увеличенный ($> 30\%$) процент спермального апоптоза ($n = 26$)
- 18,7 % – нормальный процент спермального апоптоза ($n = 6$)

Отдельные показатели спермограммы мужчин с различным уровнем фрагментации ДНК сперматозоидов

№	Исследуемый показатель	↑ уровень фр. ДНК	Н уровень фр. ДНК
1	Объем эякулята (мл)	2,4	2,2
2	Концентрация (млн./мл)	8,1	12,5
3	Подвижность кат. А (%)	4,5	11,3
4	Подвижность кат. А + В (%)	19,2	23,3
5	Нормальная морфология (%)	28,5	26,5

Характеристика групп

№	Исследуемый показатель	↑ уровень фрагм. ДНК	Н уровень фрагм. ДНК
1	Средний возраст жен пациентов (лет)	29,2	28,9
2	Средний возраст пациентов (лет)	33,1	31,8
3	Средний уровень ФСГ жен	5,8	5,3
4	Длительность стимуляции (дней)	9,8	9,4
5	Доза гонадотропинов (амп.)	35,1	35,7

Эмбриологические показатели при различных уровнях фрагментации ДНК сперматозоидов

№	Исследуемый показатель	↑ уровень фр. ДНК	Н уровень фр. ДНК
1	Среднее кол-во ооцитов на пункцию	12,3	16,2
2	Процент оплодотворения	73%	71%
3	Процент дробления %	83,5%	92%
4	Процент эмбрионов категории А и В на 3-и сутки культивирования	34,6%	58,5%
5	Процент выхода бластоцист	25,1%	45,3%

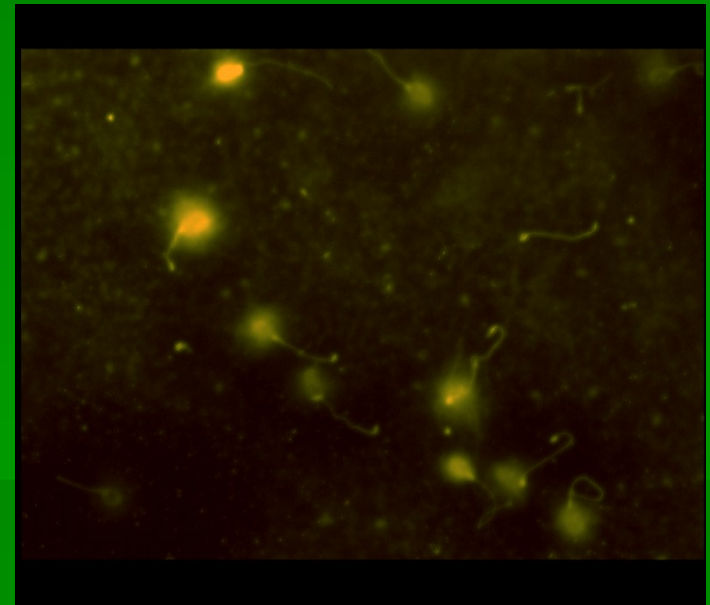
Сперматозоиды с повышенной ДНК -фрагментацией.

Результаты исследования:

- Снижения активной подвижности сперматозоидов 22-56%
- Снижения процента эмбрионов хорошего качества (категория А + В) в 2-3 раза
- Снижения процента выхода бластоцист в 2,1 раза

Примеры, клинико-лабораторные примеров

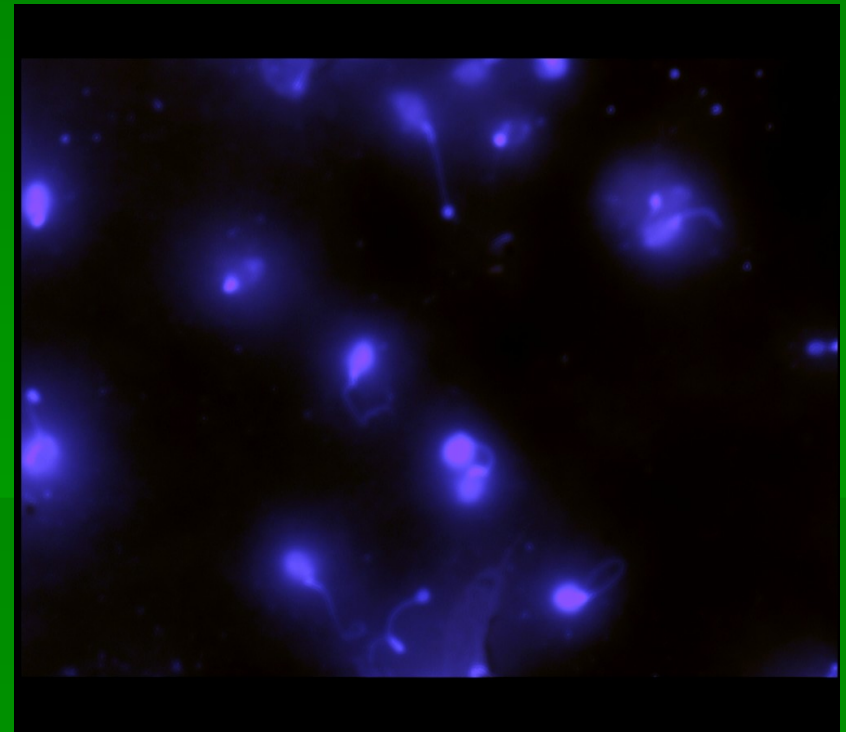
- ❖ Пациент №1: 37 лет, продолжительность бесплодия 12 лет, ОАЗС – I ст., 4 попытки ИКСИ, низкий процент оплодотворения при ИКСИ (45%). В последней – использование яйцеклеток супруги и ДО. Эмбриологическая картина идентична.



Уровень фрагментации ДНК сперматозоидов 87%.

Результаты

- ❖ Пациент №2: 28 лет, продолжительность бесплодия 5 лет, 1 попытка ИКСИ. Уровень фрагментации ДНК 77%.
- ❖ Повторная попытка -уровень фрагментации ДНК сперматозоидов 27% после проведенного лечения.
- ❖ – беременность (гетерозиготная двойня).

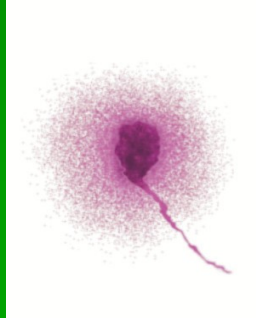


Выводы

- Определение фрагментации ДНК сперматозоидов является важным дополнением к стандартному обследованию
- Показанием для данного исследования являются множественные неудачные попытки ЭКО – ICSI, неудовлетворительные эмбриологические показатели в программах ЭКО – ICSI, бесплодие неясного генеза
- *Получение стойкой ремиссии – причинной патологии, адекватная подготовка – залог успешной программы ЭКО – ICSI*



Подготовка к программе ЭКО при выявлении фрагментации ДНК



Исключение негативных влияний внешней среды (курение, алкоголь, перегревание и т.п.)

- Антиоксидантная терапия 3 мес.
- Лечение варикоцеле
- Противовоспалительная терапия
- Применение микроэлементов (Zn)

**Спасибо за
внимание**

