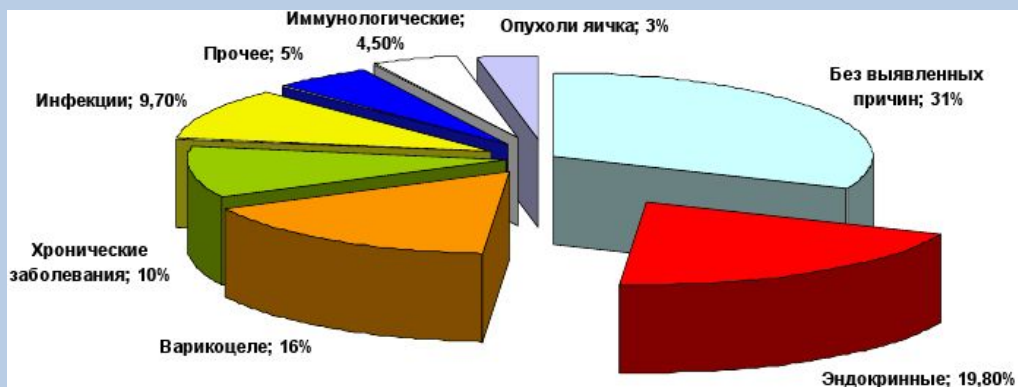




ФРАГМЕНТАЦИЯ ДНК СПЕРМАТОЗОИДОВ ЧЕЛОВЕКА

ФГБНУ «НИИ АГиР им. Д.О. Отта»
отделение ВРТ

к.б.н., м.н.с., эмбриолог Комарова Е.М.



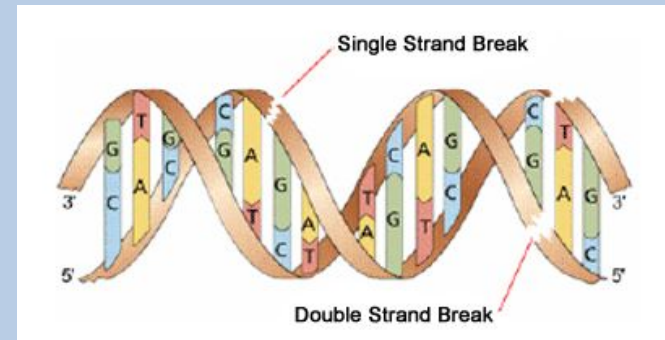
Этиология мужского бесплодия



До **20%** случаев идиопатического бесплодия связано с нарушением целостности ДНК сперматозоидов

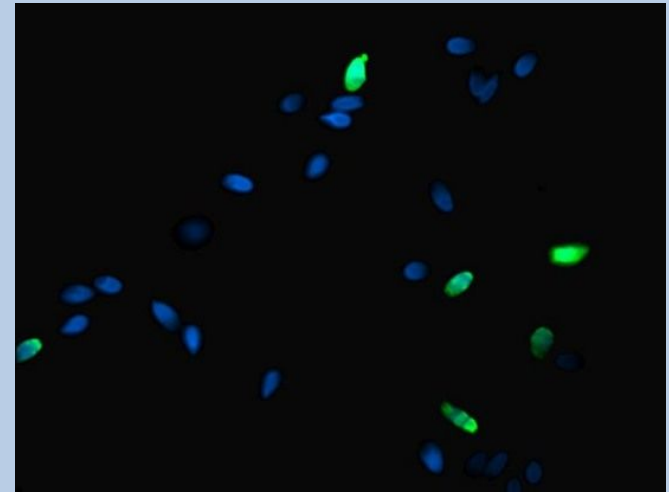
SCSA Diagnostic Business Briefing. Sperm DNA Fragmentation. The role of the Urologist // Male Infertility.- 2005. – 4p.

Фрагментация ДНК определяется наличием однонитевых и двунитевых разрывов



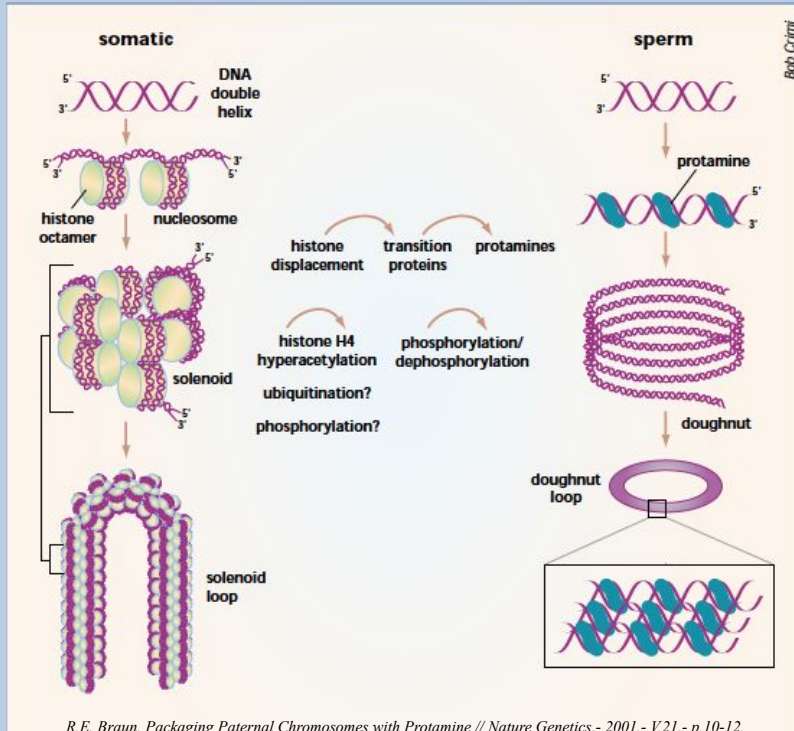
Причины, приводящие к возникновению разрывов в ДНК сперматозоида:

- нарушение компактизации хроматина в процессе спермиогенеза
- окислительный стресс
- апоптоз

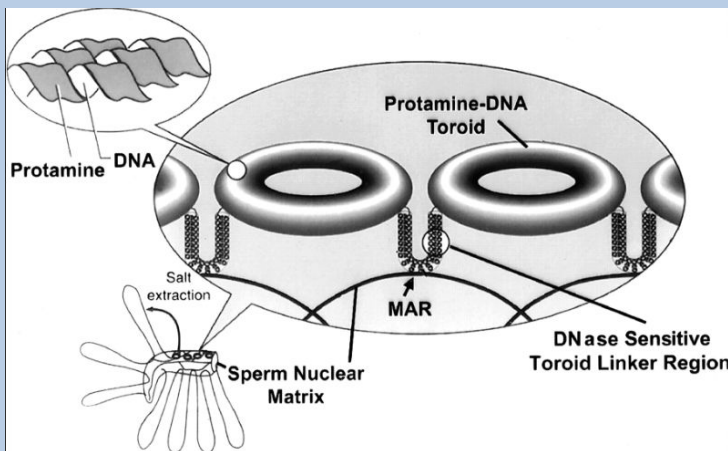


TUNEL assay

ОСОБЕННОСТИ СТРУКТУРНОЙ ОРГАНИЗАЦИИ ХРОМАТИНА СПЕРМАТОЗИОДА ЧЕЛОВЕКА



- замена ГИСТОНОВЫХ белков на протамины
- 10-15% остаточных ГИСТОНОВ
- по сравнению с ДНК соматической клетки ДНК сперматозоида менее сверхспирализована
- доменная организация хроматина: структура тороидов и линкерные области



НАРУШЕНИЕ КОМПАКТИЗАЦИИ ХРОМАТИНА СПЕРМАТОЗОИДА В СПЕРМИОГЕНЕЗЕ

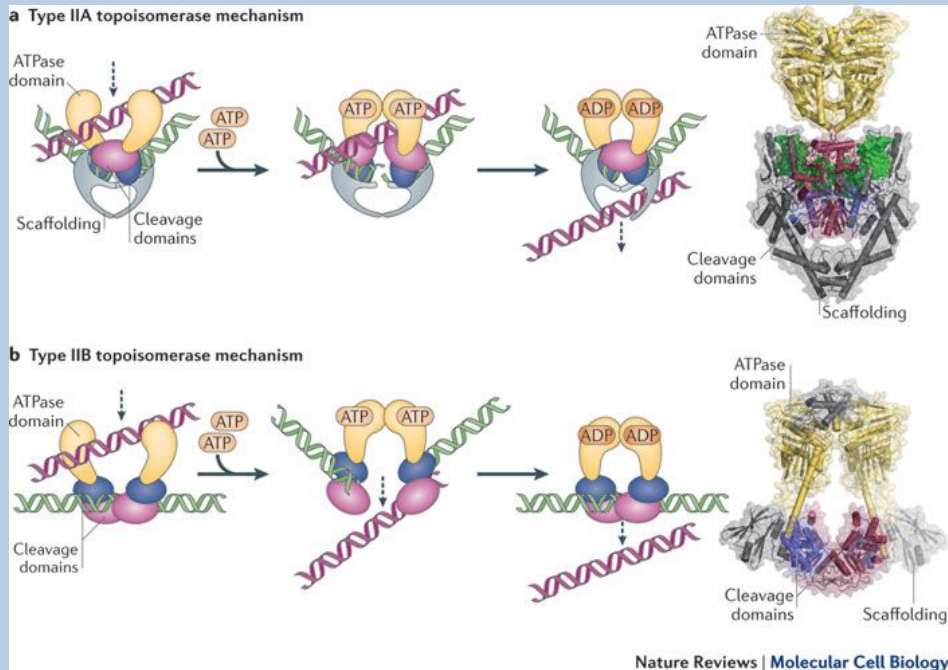
Протамины P1 и P2

534

K. Biegeleisen / Journal of Theoretical Biology 241 (2006) 533–540

	10	20	30	40	50
P1:	123456789012345678901234567890123456789012345678901				
	MAFYRCCRSQSRSRYYRQRQSRRRRRRSQTRRRAMRCCRPYRPRCRRH				
P2:	123456789012345678901234567890123456789012345678901234567				
	RTHGGSHYRRRHCSRRLHRIHRRQHRSCRRRKRRSCRHRRRHRRCRTRKRTCRRH				
	12345678901234567890123456789012345678901234567				
	10	20	30	40	50

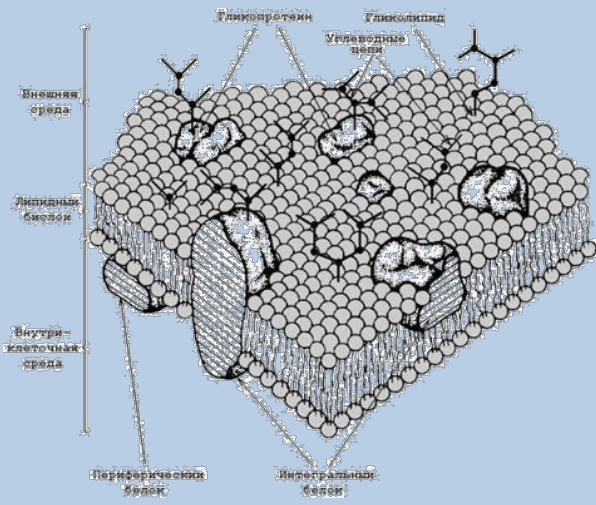
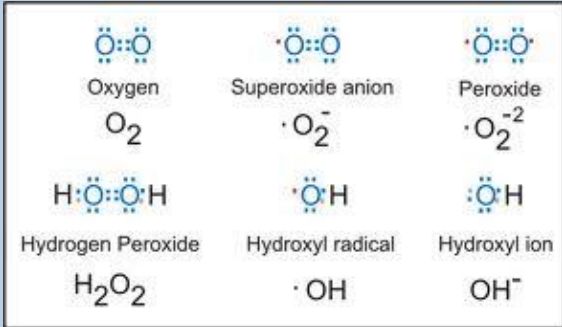
Fig. 1. Amino acid sequences of protamines P1 and P2. The vertical lines indicate the likely sites of disulfide bond formation, except for the slanted line at the C-terminal end, where a disulfide bond cannot currently be formed because of excessive distance between the cysteine residues.



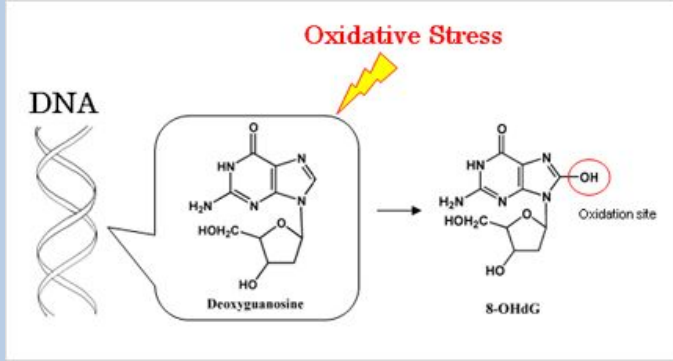
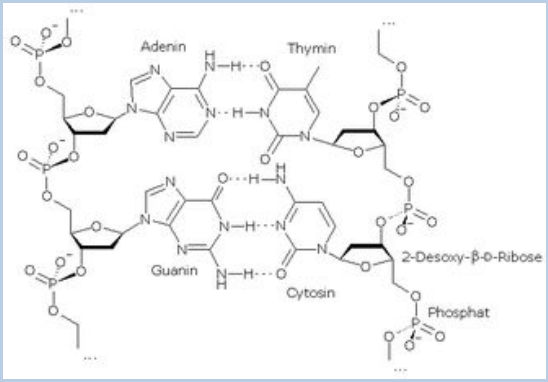
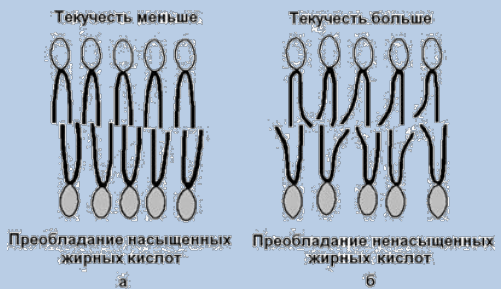
Seychelle M. Vos, Elsa M. Tretter, Bryan H. Schmidt & James M. Berger: All tangled up: how cells direct, manage and exploit topoisomerase function // Nature Reviews Molecular Cell Biology.- 2012.- V.12.- p.827-841.

В процессе замены гистонов на более основные белки для снятия торсионного напряжения требуется работа эндонуклеазы – топоизомеразы II

ОКИСЛИТЕЛЬНЫЙ СТРЕСС



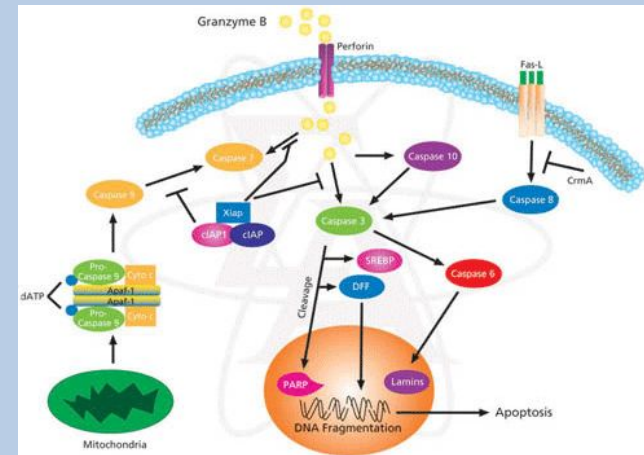
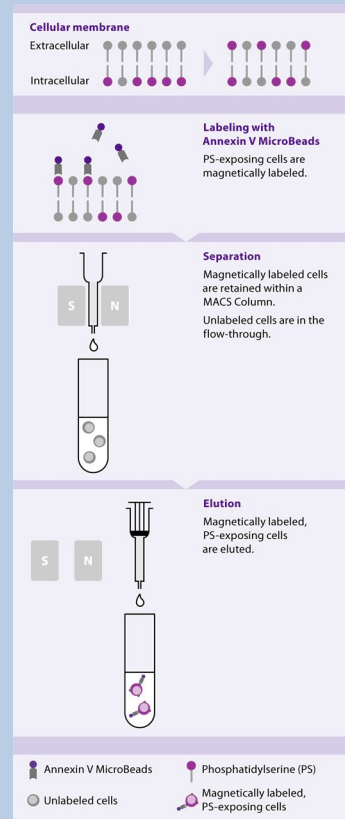
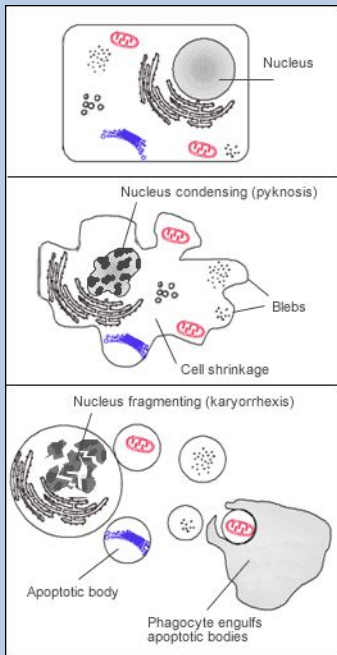
- Насыщенные жирные кислоты:**
(без двойных связей)
- пальмитиновая кислота $C_{15}H_{31}COOH$
 - стеариновая кислота $C_{17}H_{35}COOH$
- Мононенасыщенные жирные кислоты:**
(с одной двойной связью)
- олеиновая кислота $C_{17}H_{33}COOH$
 - пальмитоолеиновая кислота $C_{18}H_{35}COOH$
- Полиненасыщенные жирные кислоты:**
(с двумя и более двойными связями)
- линолевая кислота $C_{17}H_{31}COOH$
 - линоленовая кислота $C_{17}H_{29}COOH$
 - арахионовая кислота $C_{19}H_{31}COOH$



8-гидрокси-2' деоксигуанозин модифицированное основание (8-OHdG)

АПОПТОЗ

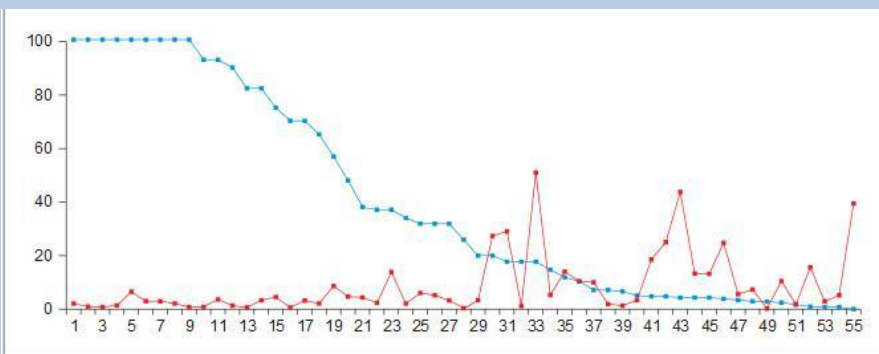
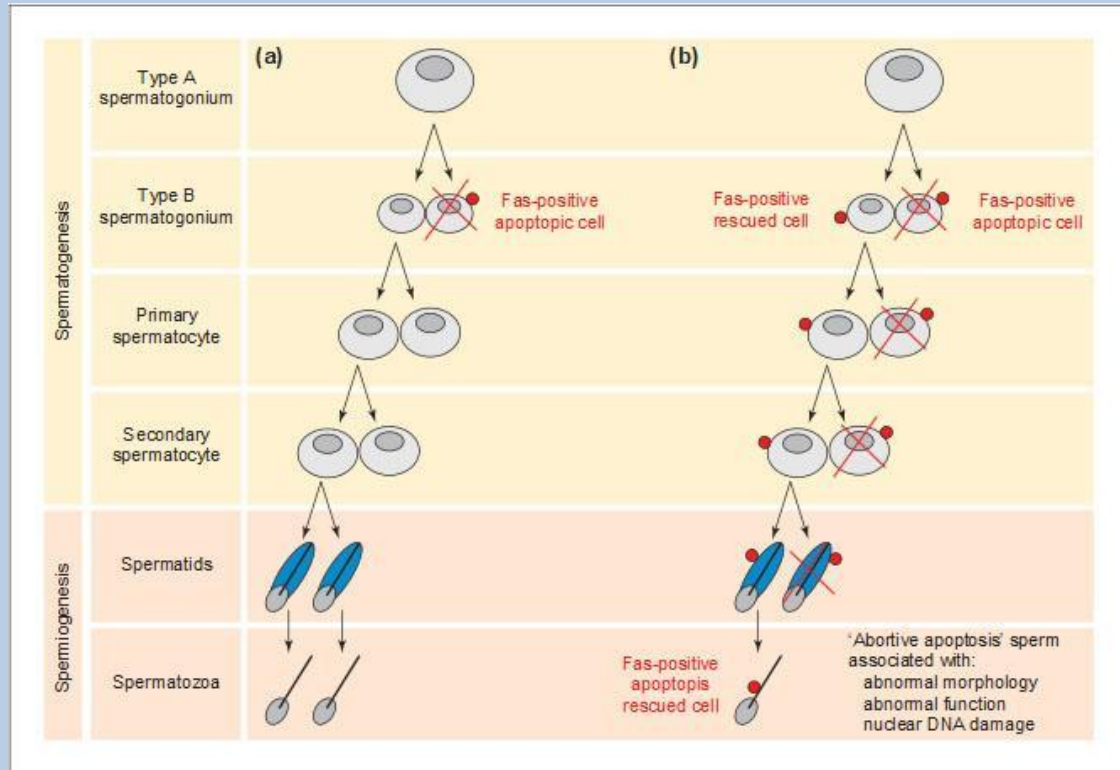
Апоптоз представляет собой результат реализации генетически запрограммированной клеточной гибели



Основной путь запуска апоптоза

Схема отбора сперматозоидов с использованием Аннексин V - меченых микросфер

В норме в 50-60% мужских половых клеток, вступающих в первое деление мейоза, запускается процесс апоптоза



Связь между концентрацией сперматозоидов в эякуляте ($\cdot 10^6$) и долей Fas-позитивных сперматозоидов

МЕТОДЫ ДЕТЕКЦИИ ФРАГМЕНТАЦИИ ДНК СПЕРМАТОЗОИДА

Прямые методы исследования

- Terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated deoxyuridine triphosphate-nick-end labelling assay (TUNEL)
- Comet assay

Непрямые методы исследования

- Sperm Chromatin Structure Assay (SCSA)
- окрашивание с помощью акридинового оранжевого

Метод Terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated deoxyuridine triphosphate-nick-end labelling assay (TUNEL)

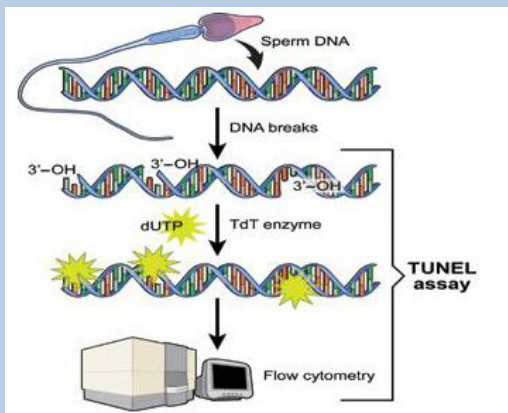
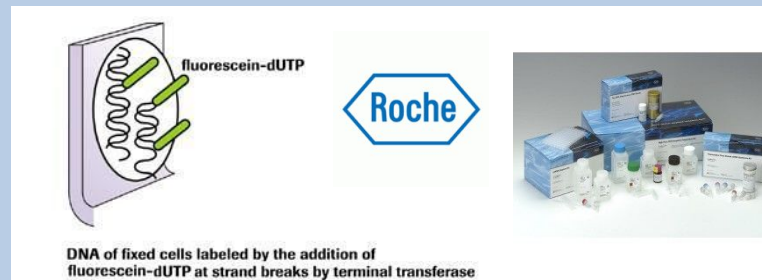
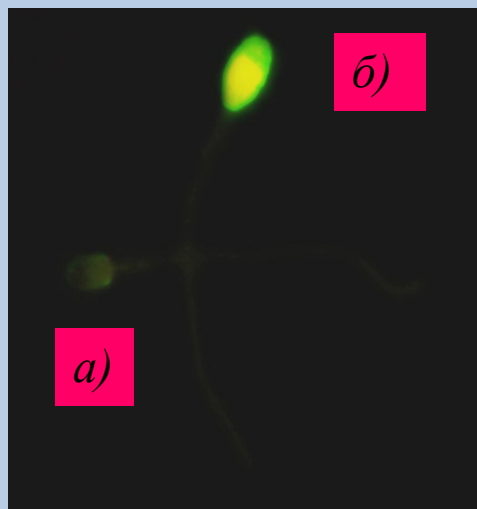
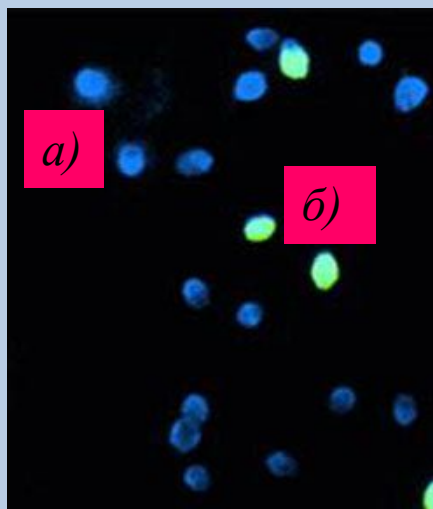


Схема TUNEL assay

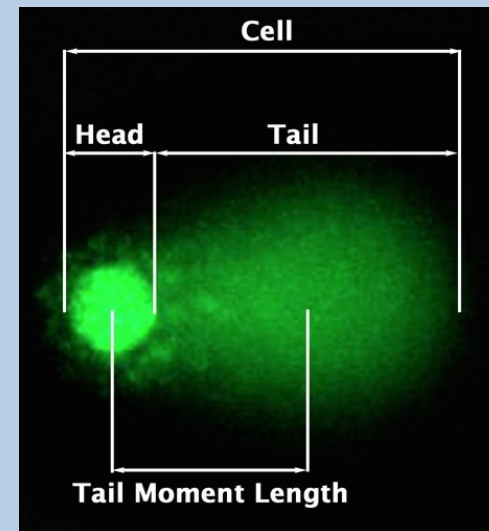
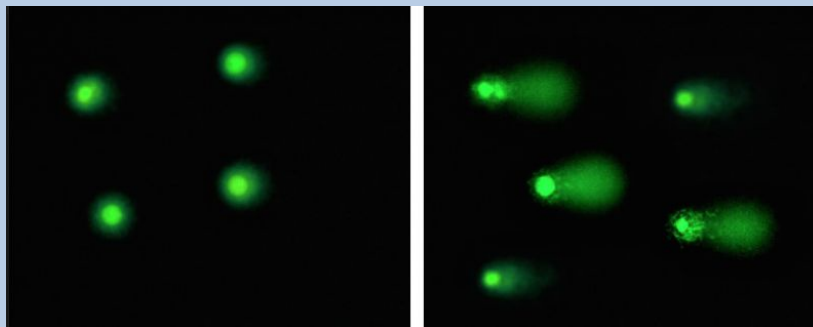
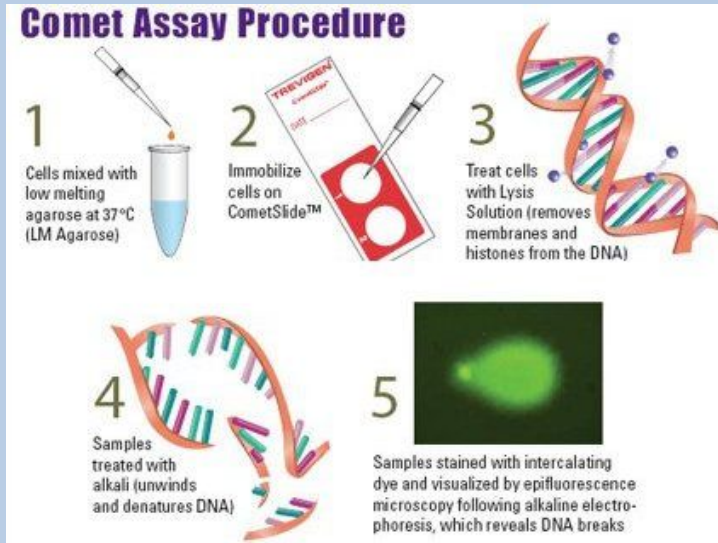


In Situ Cell Death Detection Kit, Fluorescein, Roche (Germany)



Сперматозоиды с а) интактной ДНК б) фрагментированной ДНК
TUNEL assay

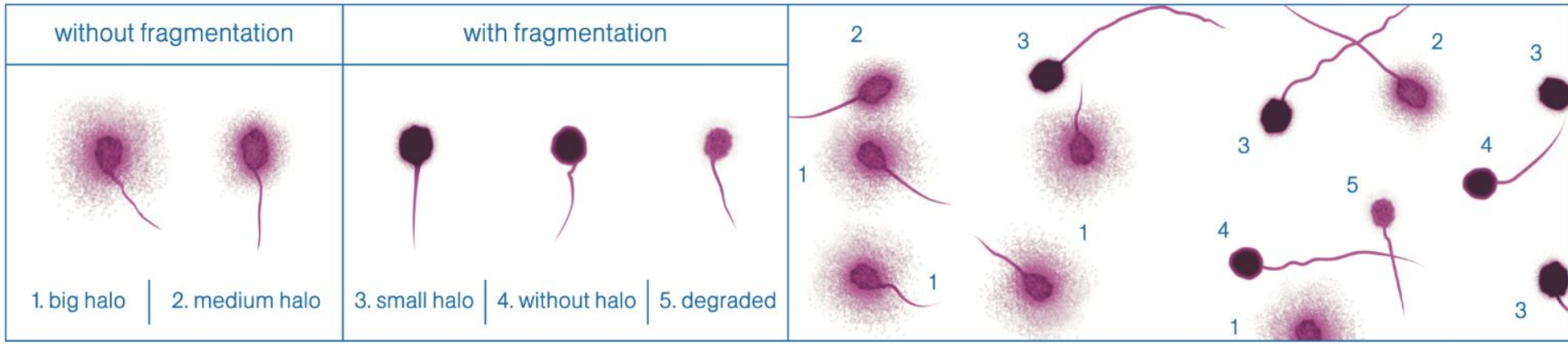
Метод Comet Assay



Comet assay



halosperm[®]
 Kit REF HT-HS10 for 10 determinations

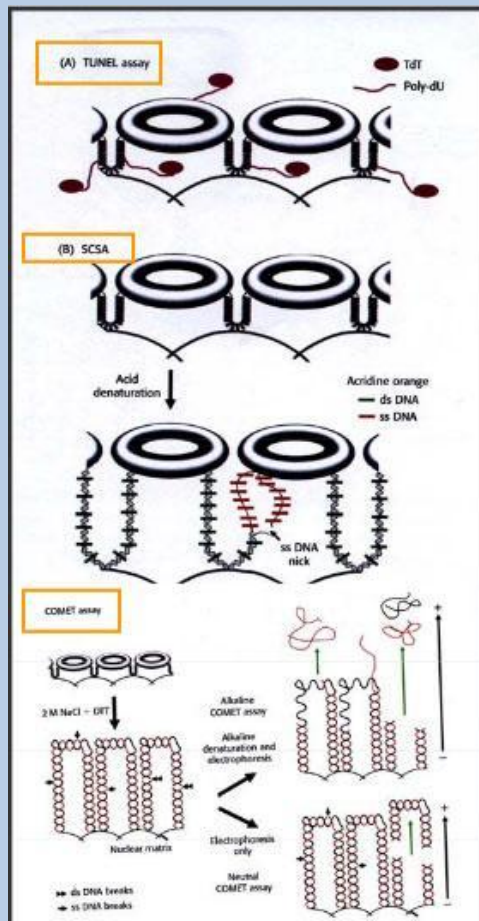


петли ДНК формируют ореол дисперсии хроматина

ядра сперматозоидов с фрагментированной ДНК не развивают ореол дисперсии или ореол минимален

Оценка целостности ДНК сперматозоида с помощью окрашивания красителем акридиновым оранжевым

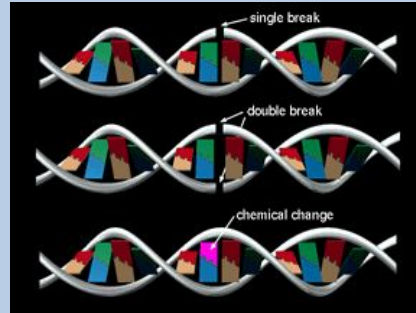
Метод Sperm Chromatin Structure Assay (SCSA)



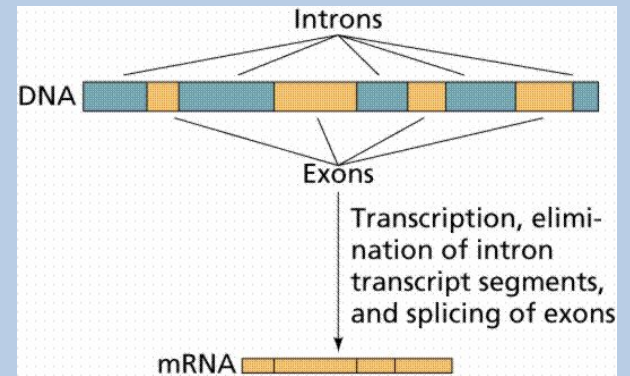
	TUNEL	COMET		SCSA
		neutral	alkaline	
direct	+	+	-	-
SS	+	-	+	+
DS	+	+	-	+

Прогностическое значение фрагментации ДНК

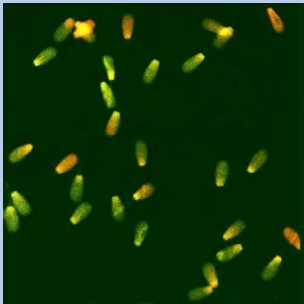
- Тип повреждения ДНК



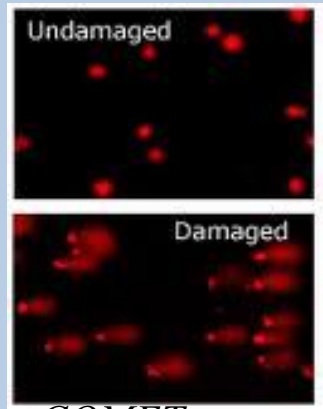
- Участки ДНК, в которых произошло нарушение целостности



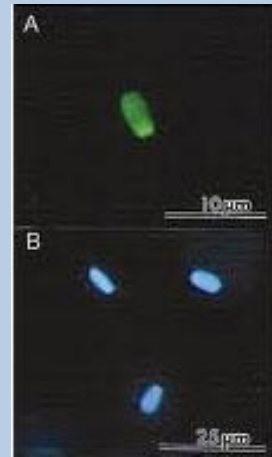
- Метод оценки целостности ДНК



SCSA



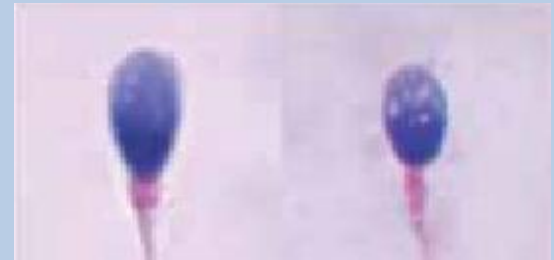
COMET assay



TUNEL assay

- Выбор сперматозоида для оплодотворения

1. Маркеры целостности ДНК сперматозоида
2. Степень повреждения ДНК единичного сперматозоида



WHO, 2010

- Повреждения ДНК, происходящие при предобработке спермы для оплодотворения



- Репарация повреждений ДНК сперматозоида ферментами ооцита



ВЛИЯНИЕ ФРАГМЕНТАЦИИ ДНК СПЕРМАТОЗОИДОВ НА ИСХОД ПРОГРАММ ВРТ

- Внутриматочная инсеминация

Table 31.1 Influence of sperm DNA damage on pregnancy rates in IUI treatment

References	Patients (<i>n</i>)	Pregnancy rates impaired	Test applied	DNA fragmentation index (DFI)-threshold suggested (%)
Duran et al. [43]	154	Yes	TUNEL	12
Saleh et al. [28]	19	Yes	SCSA	30
Bungum et al. [48]	131	Yes	SCSA	27
Muriel et al. [45]	100	No	SCD	–
Bungum et al. [38]	387	Yes	SCSA	30

IUI Intrauterine insemination; *SCSA* Sperm Chromatin Structure assay; *TUNEL* terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP nick-end labelling; *SCD* Sperm Chromatin Dispersion test

Sperm Chromatin. Edited by Zini A., Agarwal A. // Springer.- 2011.- 512pp.

- ЭКО vs. ЭКО/ICSI

Table 31.2 Influence of sperm DNA damage on fertilization, embryo development and pregnancy rates in IVF and ICSI

References	IVF (n)	ICSI (n)	Fertilization rates impaired	Embryo development impaired	Pregnancy rates impaired	Test applied
Tomsu et al. [62]	40	0	No	Yes	Yes	Comet
Morris et al. [29]	20	40	No	Yes	NA	Comet
Caglar et al. [116]	0	56	No	No	No	Comet
Lewis et al. [64]	0	77	No	NA	Yes	Comet
Nasr-Esfahani et al. [66]	0	28	No	No	NA	Comet
Larson-Cook et al. [47]	55	34	No	No	Yes	SCSA
Larson et al. [46]	24 IVF/ICSI	NA	No	No	Yes	SCSA
Saleh et al. [28]	10	4	Yes	Yes	Yes	SCSA
Bungum et al. [48]	109	66	No	No	Yes	SCSA
Gandini et al. [49]	12	24	No	Yes (blastocysts)	Yes	SCSA
Virro et al. [50]	249 IVF/ICSI	NA	No	No	Yes	SCSA
Check et al. [117]	0	106	No	No	Yes	SCSA
Payne et al. [52]	46	54	No	No	No	SCSA
Boe-Hansen et al. [44]	139	47	No	No	Yes	SCSA
Bungum et al. [38]	388	223	No	No	Yes	SCSA
Sun et al. [67]	143	0	Yes	Yes	NA	TUNEL
Lopes et al. [68]	0	150	Yes	No	NA	TUNEL
Host et al. [22]	50	61	Yes	NA	NA	TUNEL
Tomlinson et al. [61]	140	0	No	No	Yes	TUNEL
Benchaib et al. [85]	50	54	Yes	No	Yes	TUNEL
Henkel et al. [63]	208	54	No	No	No	TUNEL
Huang et al. [65]	217	86	Yes	No	No	TUNEL
Seli et al. [75]	49	NA	NA	Yes	No	TUNEL
Henkel et al. [118]	208	54	No	No	No	TUNEL
Hammadeh et al. [87]	26	22	NA	NA	No	TUNEL
Borini et al. [88]	82	50	NA	NA	Only for ICSI	TUNEL
Benchaib et al. [86]	88	234	Only for ICSI	Only for ICSI	No	TUNEL
Bakos et al. [119]	45	68	Only for IVF	No	Only for ICSI	TUNEL
Frydman et al. [120]	117	0	NA	NA	Yes	TUNEL

Фрагментация ДНК сперматозоидов и прерывание беременности

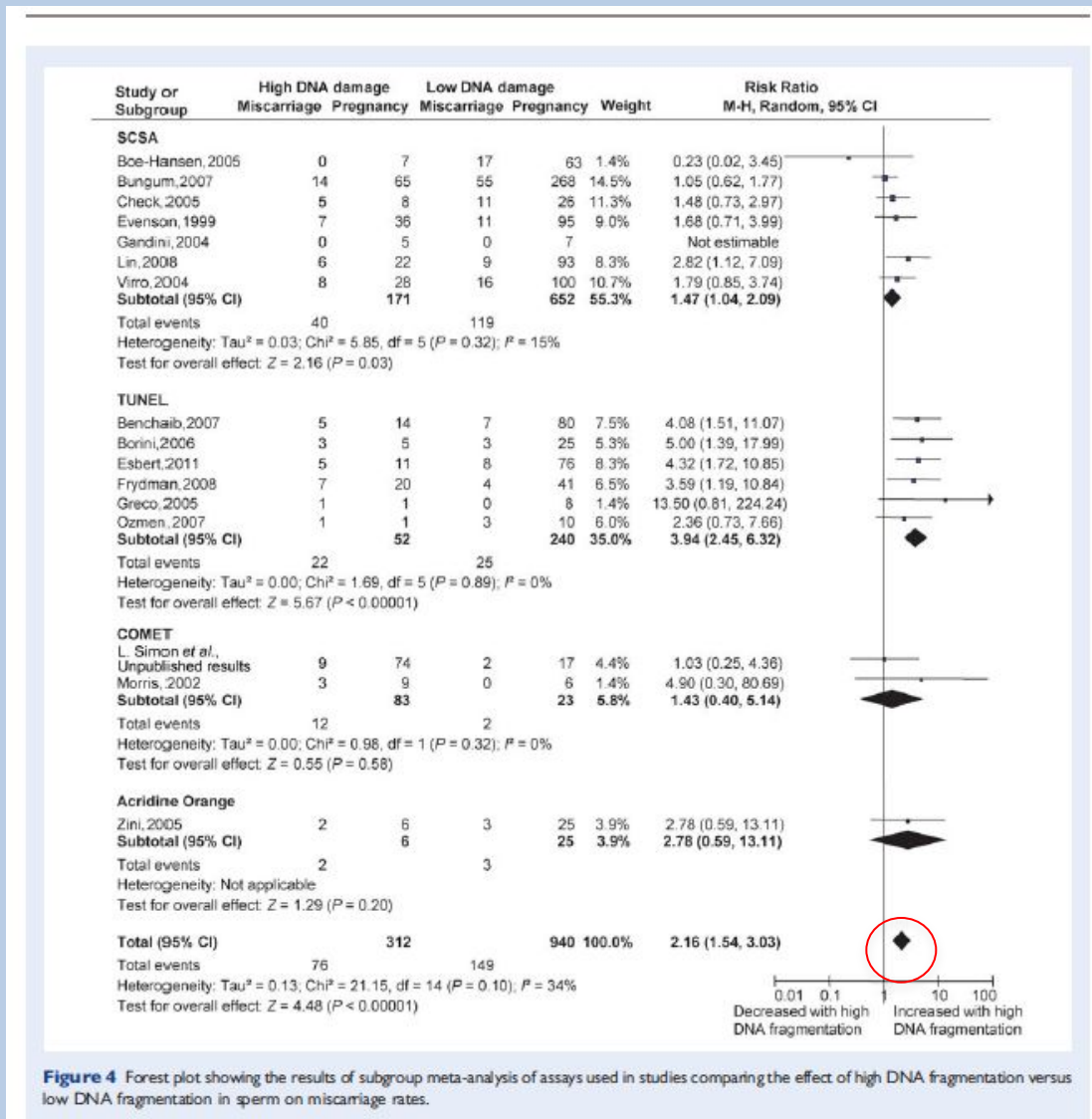


Figure 4 Forest plot showing the results of subgroup meta-analysis of assays used in studies comparing the effect of high DNA fragmentation versus low DNA fragmentation in sperm on miscarriage rates.

Robinson L., Gallos L., Corner S., et al. The effect of sperm DNA fragmentation on miscarriage rates: a systematic review and meta-analysis // HumRep. - 2012.- V.0. - №0. - p.1-10.

ПОКАЗАНИЯ

- Идиопатическое бесплодие
- После неоднократных неудачных попыток искусственного оплодотворения
- В случае выявления низкого качества эмбриона
- У пациенток с неоднократно повторяющимися выкидышами
- Отклонения в спермограмме
- Варикозное расширение вен семенного канатика.
- Мужчины в возрасте старше 45 лет.
- В случае заморозки спермы
- Повышение температуры тела в последние месяцы



«ЛЕЧЕНИЕ»

- Антиоксидантная терапия
- Методы селекции сперматозоидов (IMSI, PICSI)
- Использование тестикулярных сперматозоидов для оплодотворения