

**Komplexné andrologicko-genetické
vyšetrenie spermií
v manažmente liečby mužskej infertility**

**Černáková I.
ReproGen, s.r.o., Bratislava**

26.4.2017

PRÍČINY MUŽSKEJ NEPLODNOSTI

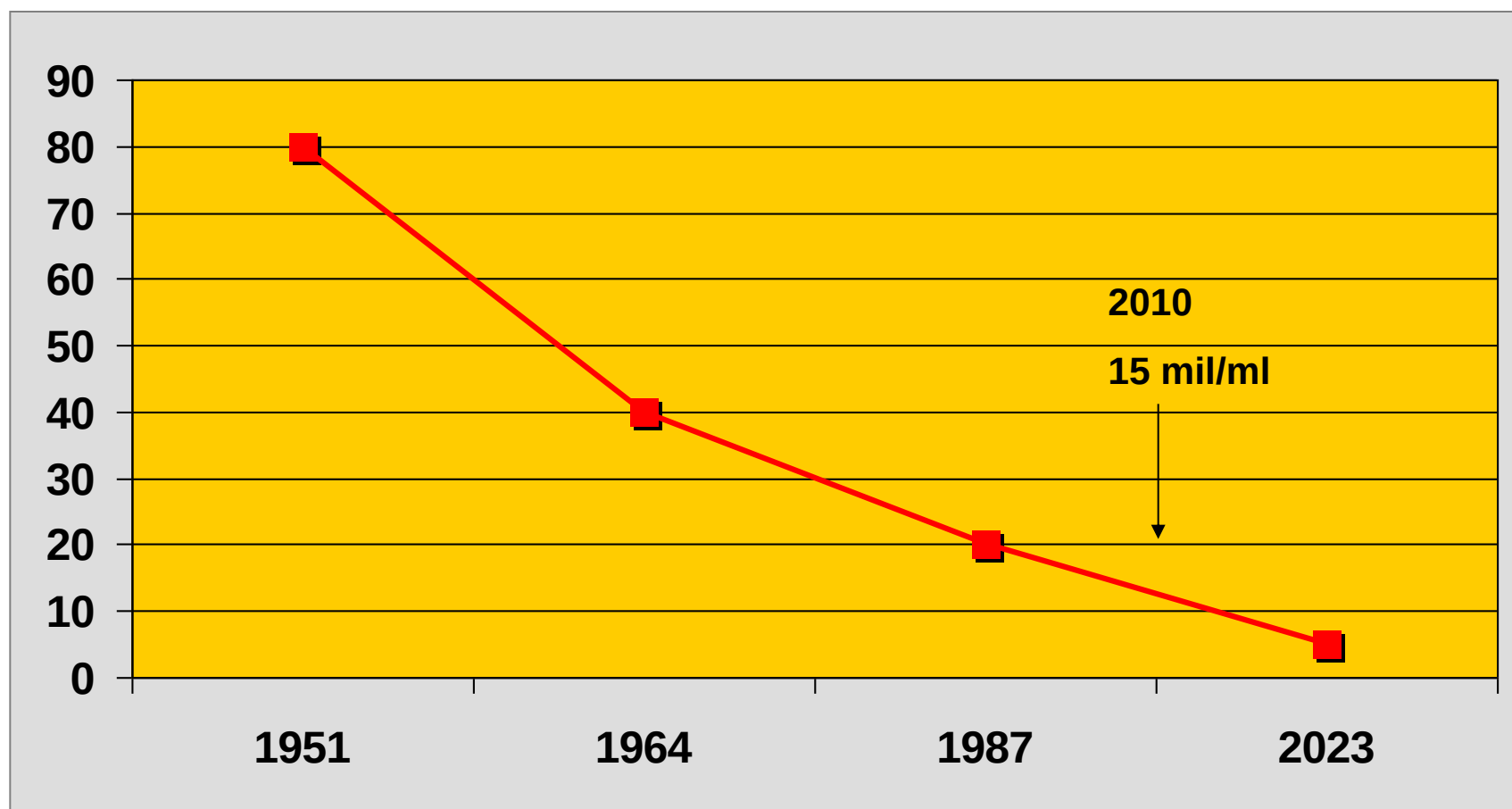
Frekvencia infertility vo svete celkovo 15 – 20%

Samotné gynekologické príčiny 40 %

Samotný andrologický faktor 40 %

Idiopatická neplodnosť 20 %

WHO DOPORUČENIE A VÝVOJ KVALITY SPERMIÍ



HISTORICKÝ VÝVOJ NÁZOROV A PRÍSTUPOV K VYŠETRENIAM SPERMIÍ

80. roky

Éra IVF

Štandardné vyšetrenie SPG

Pokročilé metódy – funkčné testy

/väzba a penetrácia spermie cez ZP, fúzia s oocytom/

90. roky

Éra ICSI

Minimalizácia významu klasických a funkčných testov

**- nezávislosť ICSI na základných parametroch SPG
a integrite funkcií spermie**

21. storočie

**Éra genetiky
v AR**

Genetické metódy v asistovanej reprodukcií

**- testy zamerané na genetický obsah a integritu DNA
spermií**

PRÍČINY PORÚCH MUŽSKEJ PLODNOSTI

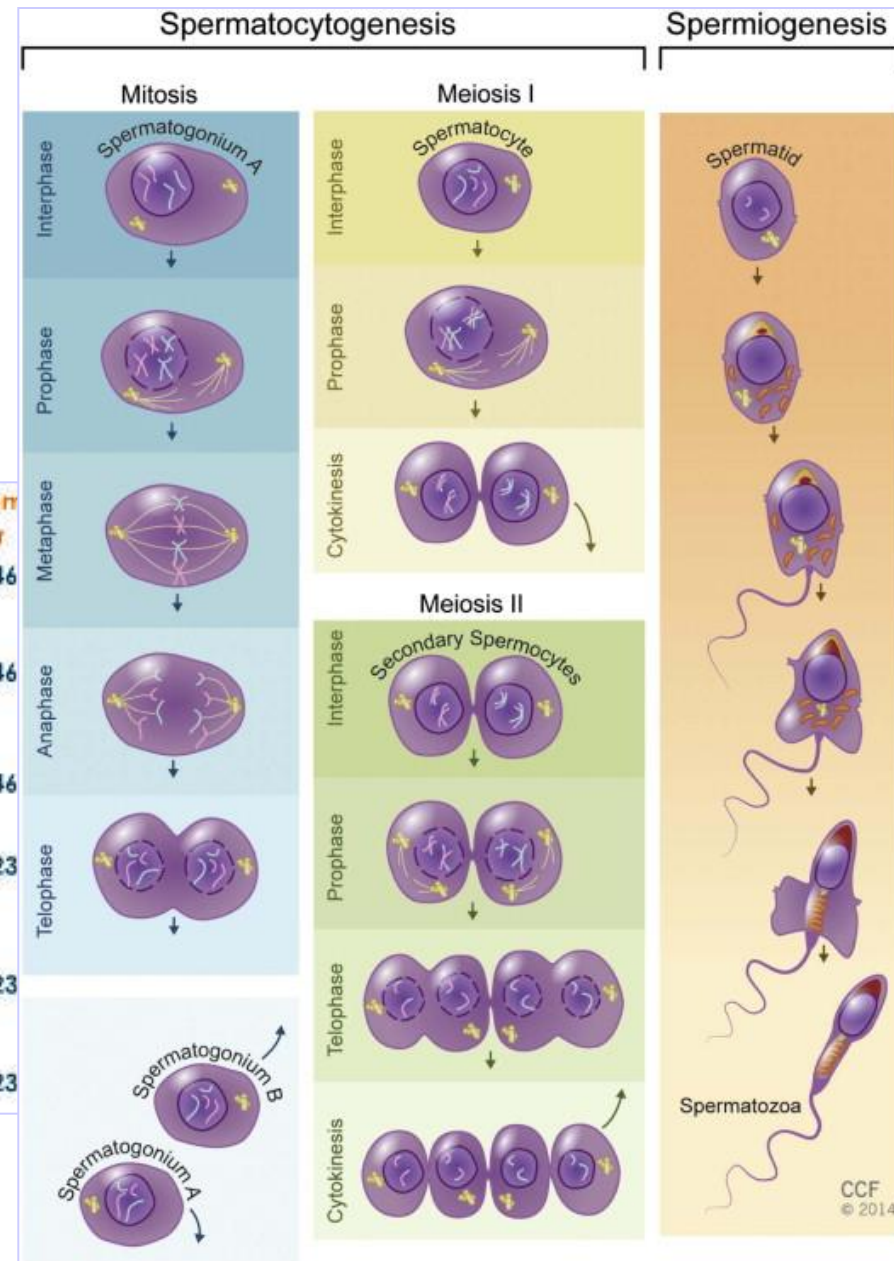
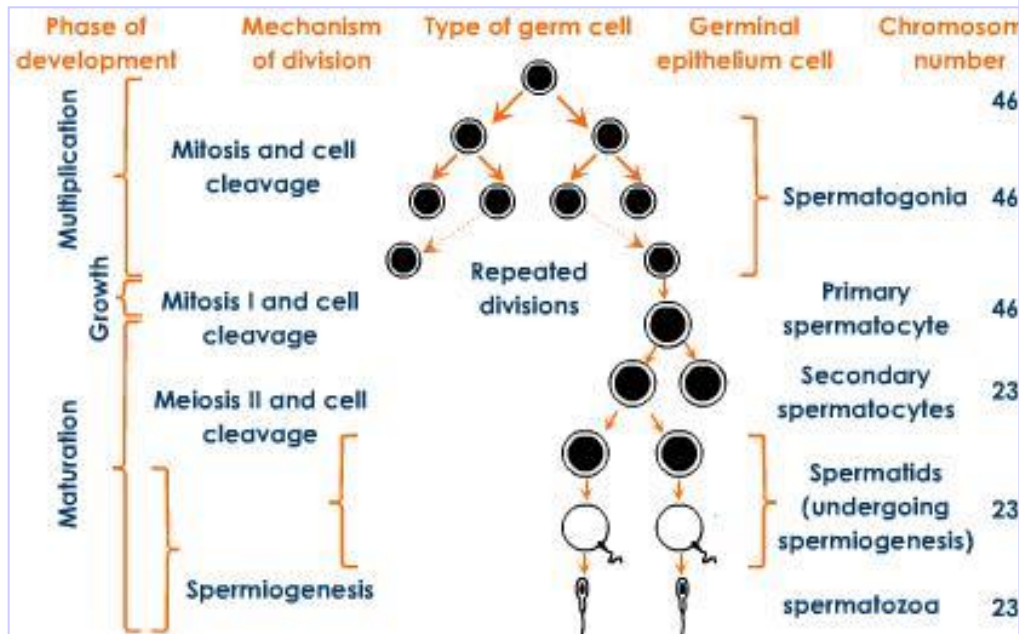
Endogénne faktory

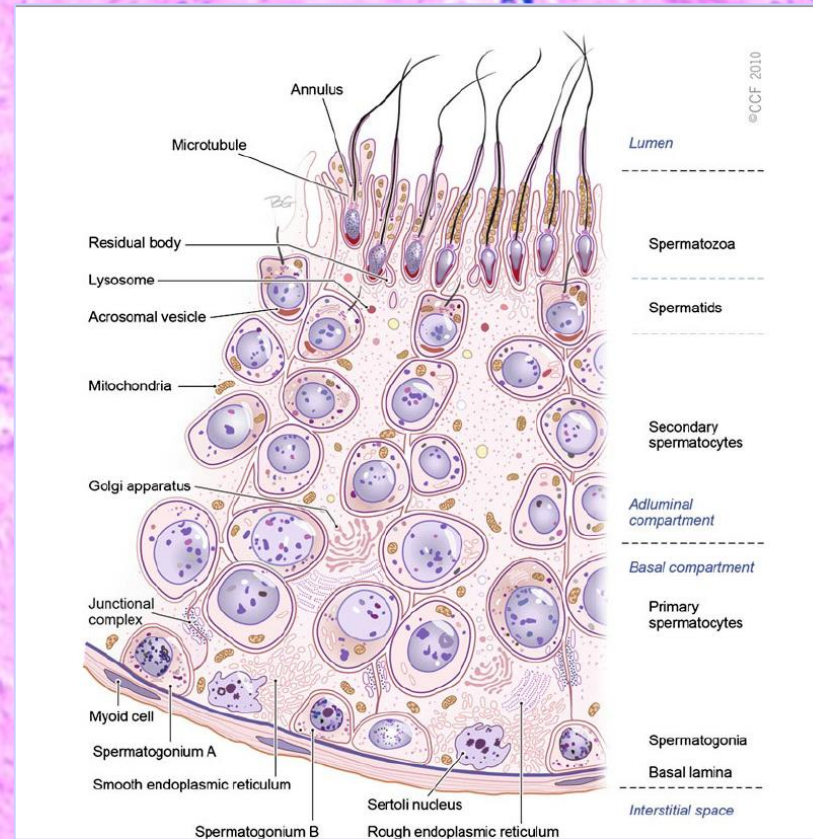
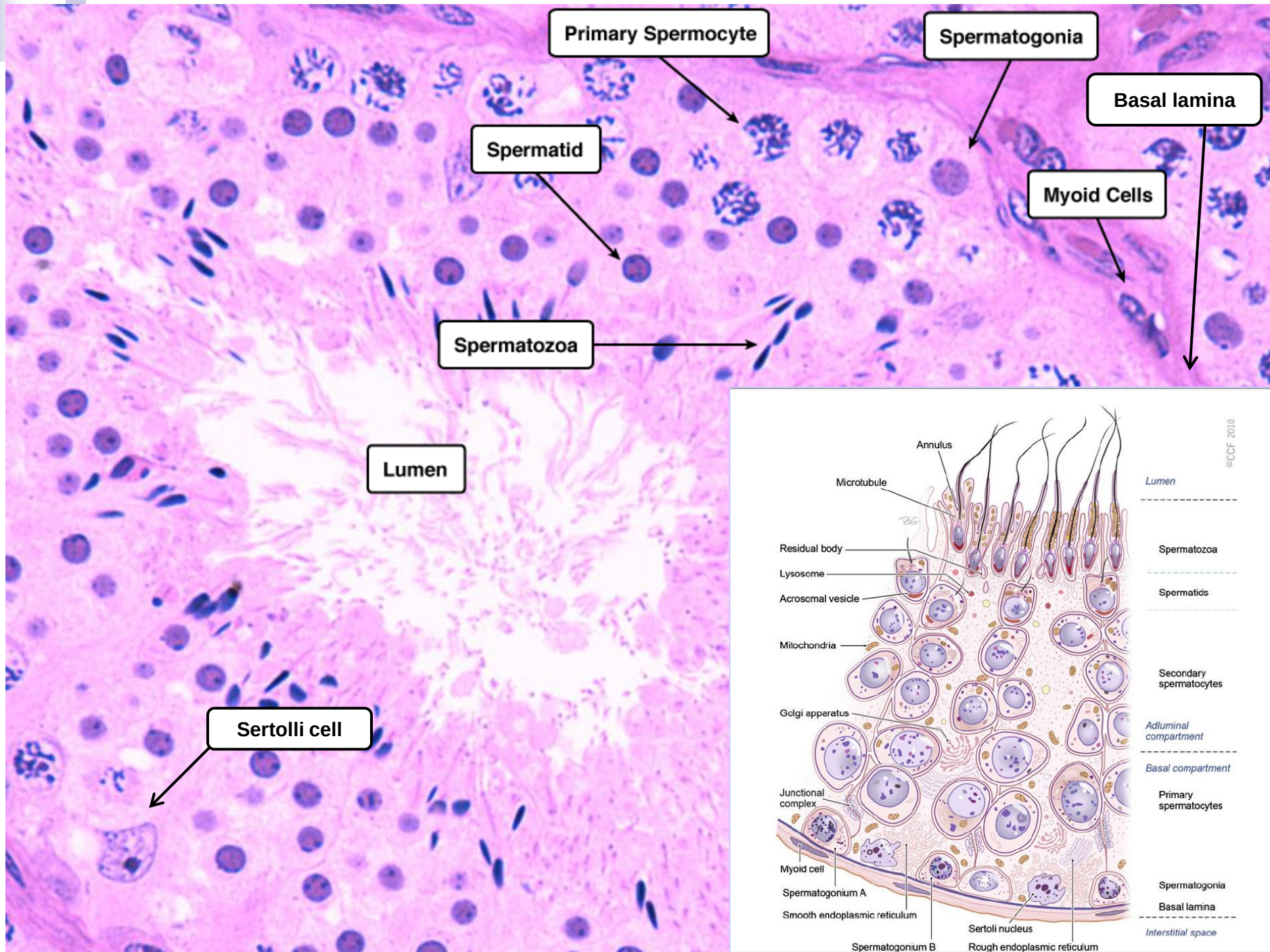
- poruchy tvorby spermií
- poruchy priechodnosti semenotvorných kanálikov
- **genetické faktory** (translokácie, numerické CHA, Y-delécie, mutácie CFTR, mutácie v iných génoch, fragmentácia DNA, poruchy reparácie)
- iné (anatomické, hormonálne ...)

Exogénne faktory

- exhaláty
- chemizácia - herbicídy, pesticídy, insekticídy
- rádioaktívne žiarenie, mikrovlnové žiarenie, mobily
- priemyselná záťaž - ťažké kovy, teplárne
- životný štýl - nikotín, alkohol, drogy, obezita, sauna/termálne kúpele
- zápalové ochorenia, rádio-/chemoterapia

Spermatogénéza





Primordial germ cell
Spermatogonia

Spermatocyte

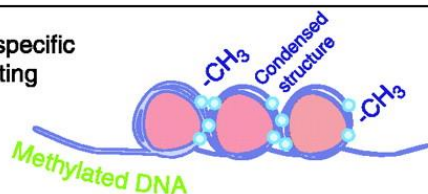
Round spermatid
Elongating spermatid
Spermatozoon

Mitosis

Meiosis

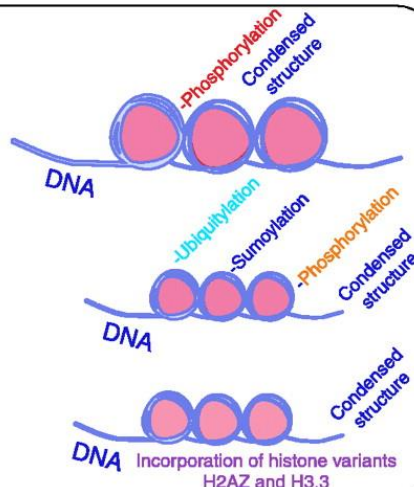
Spermiogenesis

Paternal-specific imprinting

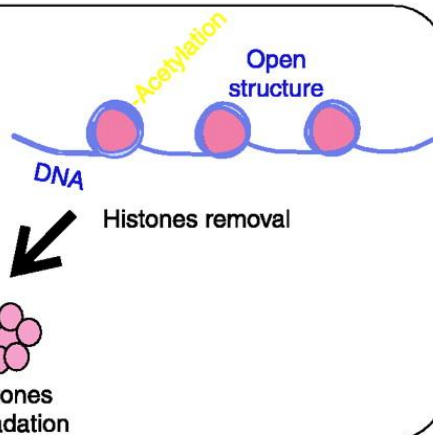


Homologous recombination

XY body formation



Histone to protamine transition



● Methylated CpGs
● Core histones and variants

Poškodenie spermii

Vrodené – paternálny imprinting

Chromozómová aneuploidia

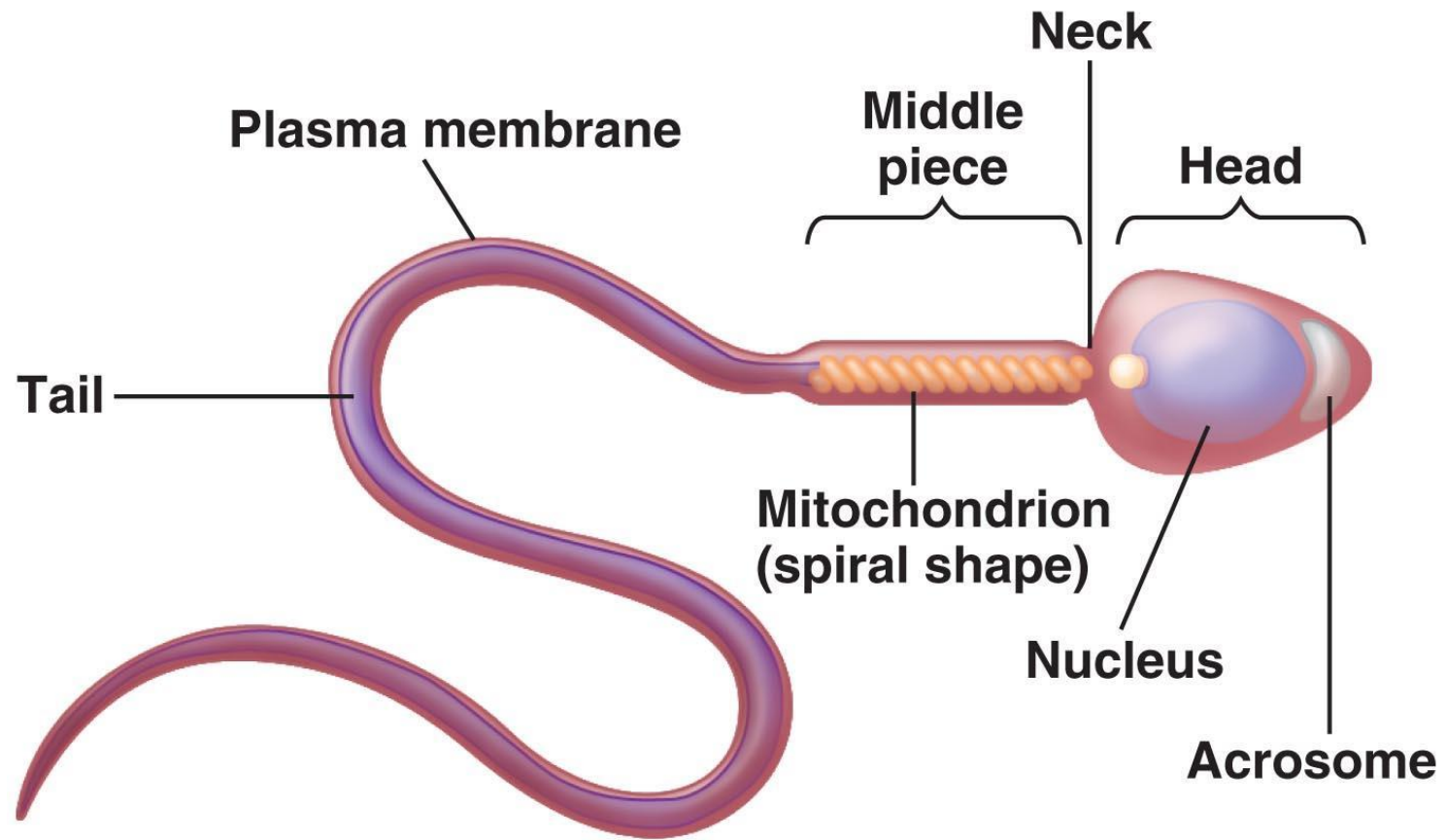
Poruchy morfológie

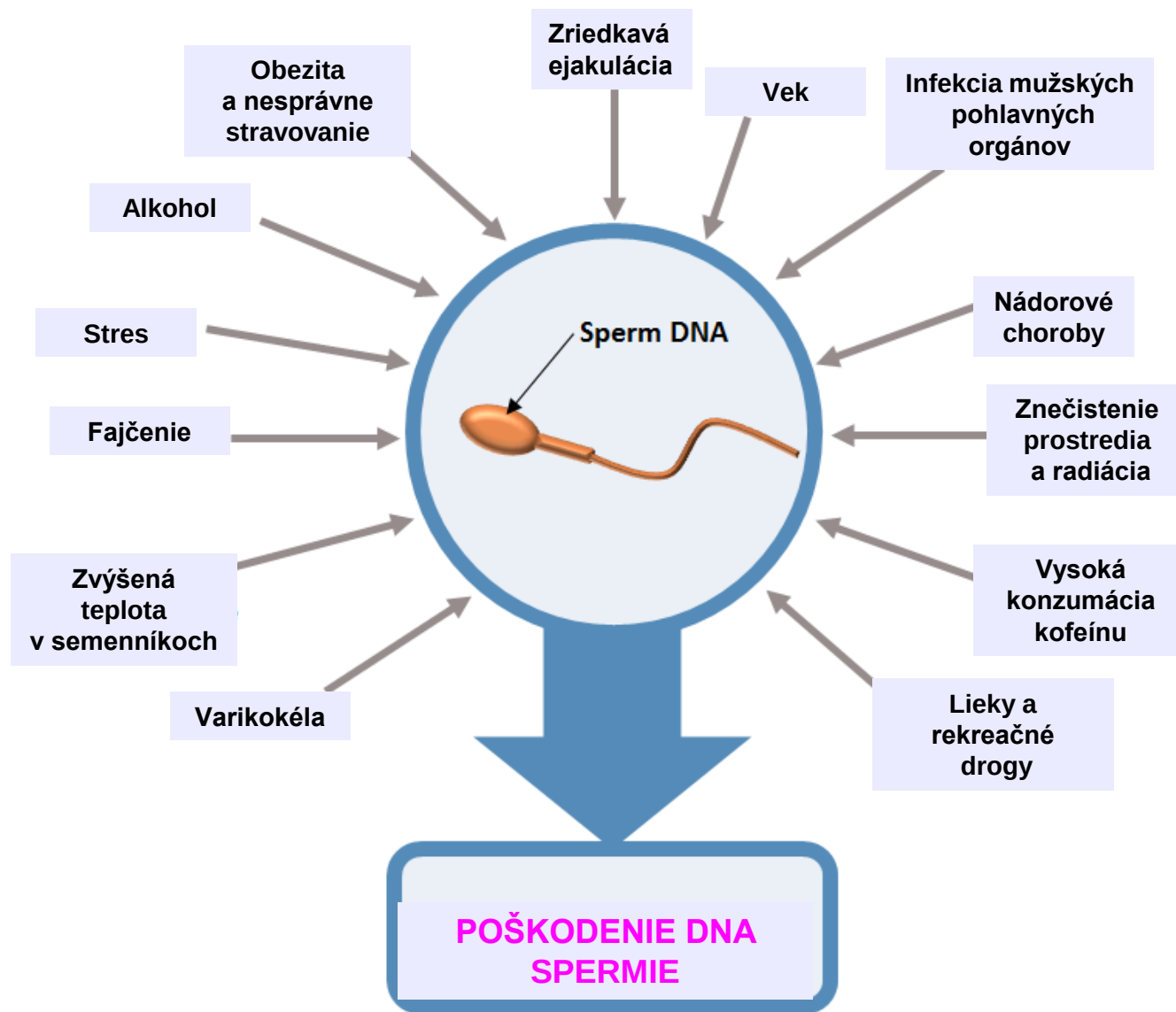
Poruchy vitality
(nedostatok mitochondrií)

Zvyšky cytoplazmy

Protamínová insuficiencia

Anatómia spermie





MUŽSKÉ ZÁRODOČNÉ BUNKY

Charakteristika

- Nízka kvalita prejavujúca sa patologickými zmenami morfológie
- Znížená pohyblivosť
- Znížená celistvosť chromatinu v jadrách
- Zvýšený výskyt DNA fragmentácie
- Znížená schopnosť rozpoznať oocyt a fúzovať s ním
- Mutácie súvisiace s rôznymi ochoreniami u ľudí



Infertilita



Dominantné monogénové choroby
Detské onkologické ochorenia
Ciliopatie, respiračné choroby

Laboratórne vyšetrenia mužov s poruchami plodnosti

Vyšetrenie krvi

- **Hladina hormónov** – *testosterón, LH, FSH, prolaktín, SHBG, estrogény*
- **Onkomarkery** – *PSA, fPSA, alfaFP, betaHCG, LD ...*
- **Genetické vyšetrenie** – *karyotyp, mutácie v géne CFTR, mikrodelécie Y*
 - *FSHB/FSHR genotyp, LHCGR mutácie,*
- **Vyšetrenie imunologických markerov** – *bunková, humorálna imunita*

Vyšetrenie ejakulátu

- **Spermigram**
- **Komplexné vyšetrenie spermií** – *DNA fragmentácie, chromozómové aneuploidie, protamíny, voľné kyslíkové radikály*

Vyšetrenie moča

- **Vylúčenie infekcie** - *PCR /ureaplazma, mycoplazma, chlamýdie*

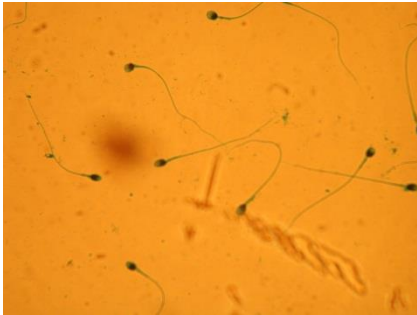
Vyšetrenie ejakulátu

- **Vyšetrenie spermiogramu** - stanovenie koncentrácie spermií
 - vyšetrenie pohyblivosti spermií
 - vyšetrenie morfológie spermií
- Stanovenie koncentrácie leukocytov v ejakuláte
- Pomer živých/mŕtvych buniek
- Prítomnosť protilátok proti spermiám v ejakuláte
- Overenie integrity akrozómu spermií
- Stanovenie počtu spermií s insuficienciou protamínov
- Stanovenie počtu spermií s fragmentovanou DNA
- Vyšetrenie voľných kyslíkových radikálov
- Vyšetrenie aneuploidie chromozómov v spermiách

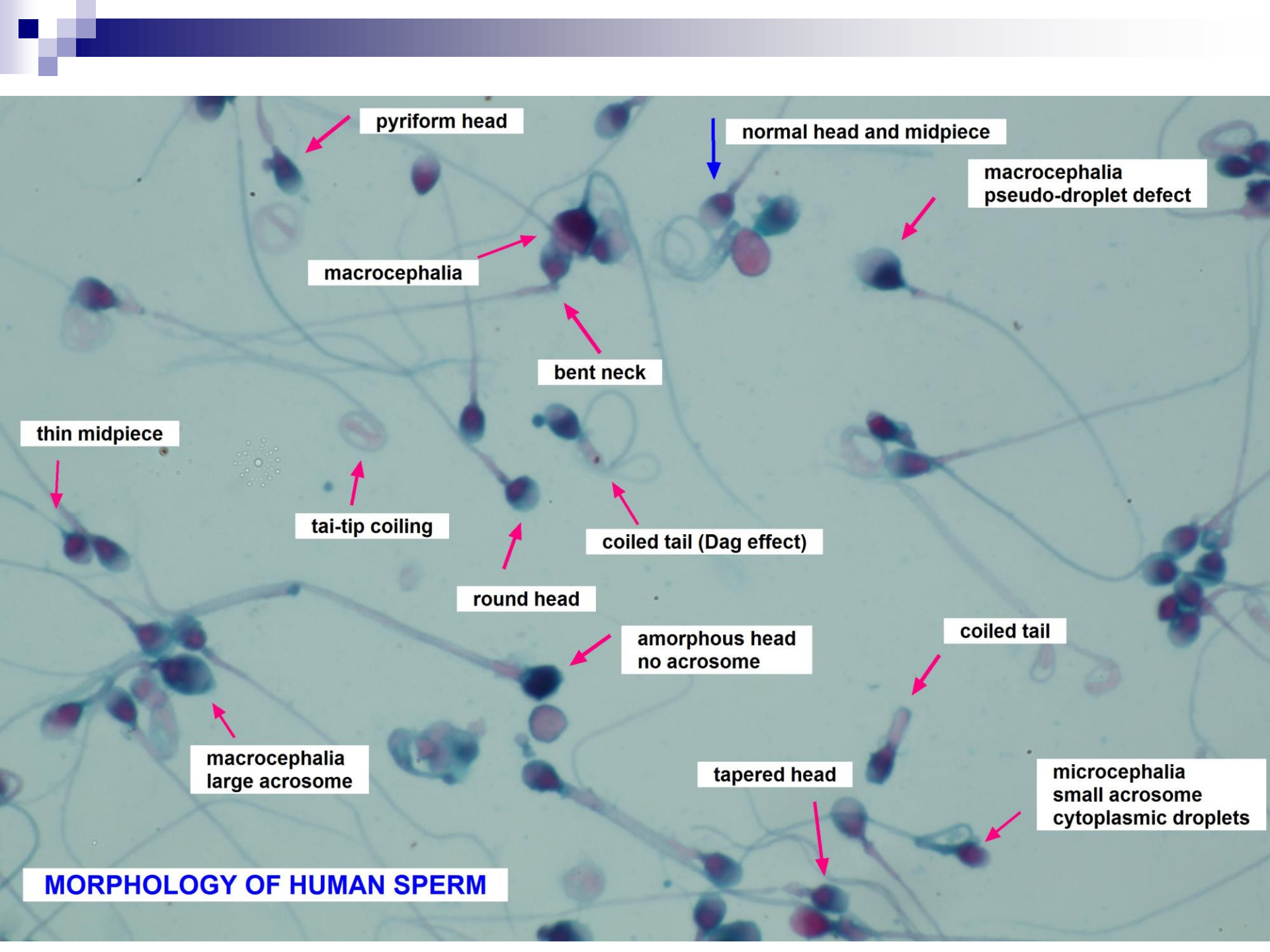
Biochemická analýza – kyselina citrónová, fruktóza

SPERMIOGRAM

(WHO 2010)



Objem	> 1,5 ml
Počet	> 15 mil/ml
Pohyblivosť	> 40 %
Progresívna pohyblivosť	> 32 %
Morfológia	> 4% normálnych spermií
pH	≥ 7,2
Liquifikácia	do 30 min
Čistota	< 1 mil/ml Leu



pyriform head

normal head and midpiece

macrocephalia
pseudo-droplet defect

macrocephalia

bent neck

thin midpiece

tai-tip coiling

coiled tail (Dag effect)

round head

amorphous head
no acrosome

coiled tail

macrocephalia
large acrosome

tapered head

microcephalia
small acrosome
cytoplasmic droplets

MORPHOLOGY OF HUMAN SPERM

LeucoTest

Vyšetrenie leukocytov v ejakuláte



**Malé okrúhle bunky
> 1 mil/ml**



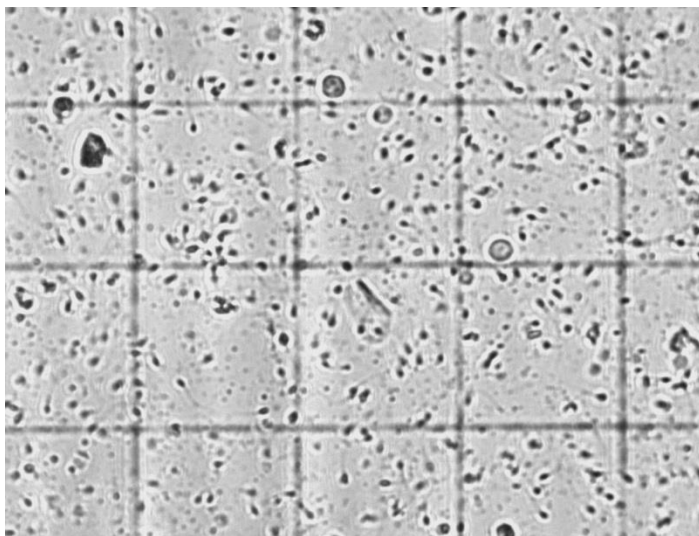
Epitelové bunky



Leu > 1 mil/ml



Urologické vyšetrenie



VITALITY TEST

living sperm

dead sperm

living sperm

dead sperm

native sperm

VitalSperm

vyšetrenie vitality spermií

dead

dead normal

living abnormal

VitalSperm

Stanovenie vitality spermíí - **Motilita < 40%**

Norma: Najmenej 58% živých spermíí



Živé nemotilné spermie



Štruktúrne defekty bičíka

+

Defekty/znížený počet mitochondrií



DNA fragmentácia
Antioxidanty + ICSI



DNA diagnostika MMAF
+ genet. konzultácia
+ IVF-ICSI + MACS



Mŕtve spermie - nekrozoospermia

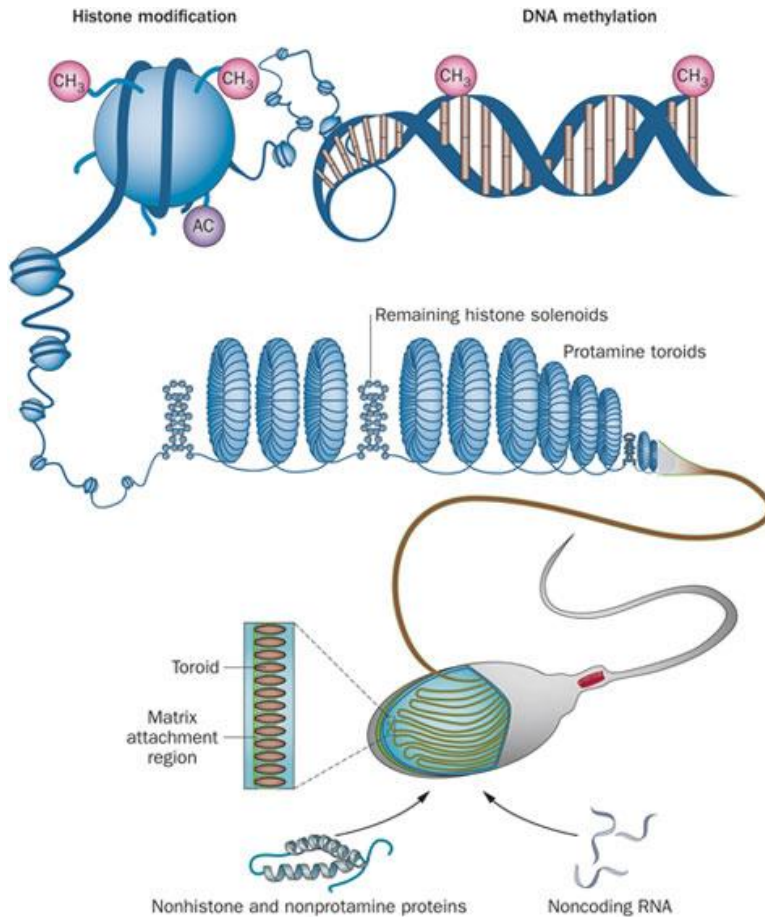


Patológia epididymu



Urológ
darcovstvo spermíí

Protamíny



- **Proteíny špecifické pre zrelé spermie**
(vs. históny v oocytoch a somatických b.)
- Proteíny spermie: 85% protamíny
15% históny
- počas spermatogenézy:
tranzícia z histónov – transitné proteíny –
- protamíny P1 a P2

Funkcie:

- **Celistvosť chromatínu v hlavičke spermii**
- **Ochrana genómu spermii**
- **DNA reparačný mechanizmus**
- **Účasť v procesoch imprintingu**

PROTAMÍNY

PROTAMINE TEST

Ak nie sú vlákna DNA dostatočne pevne „zbalené“, sú náchylnejšie na poškodenie



DNA fragmentácia



Infertilita

Infertilní muži:

- vyšší pomer históny/protamíny
- nedostatok P2

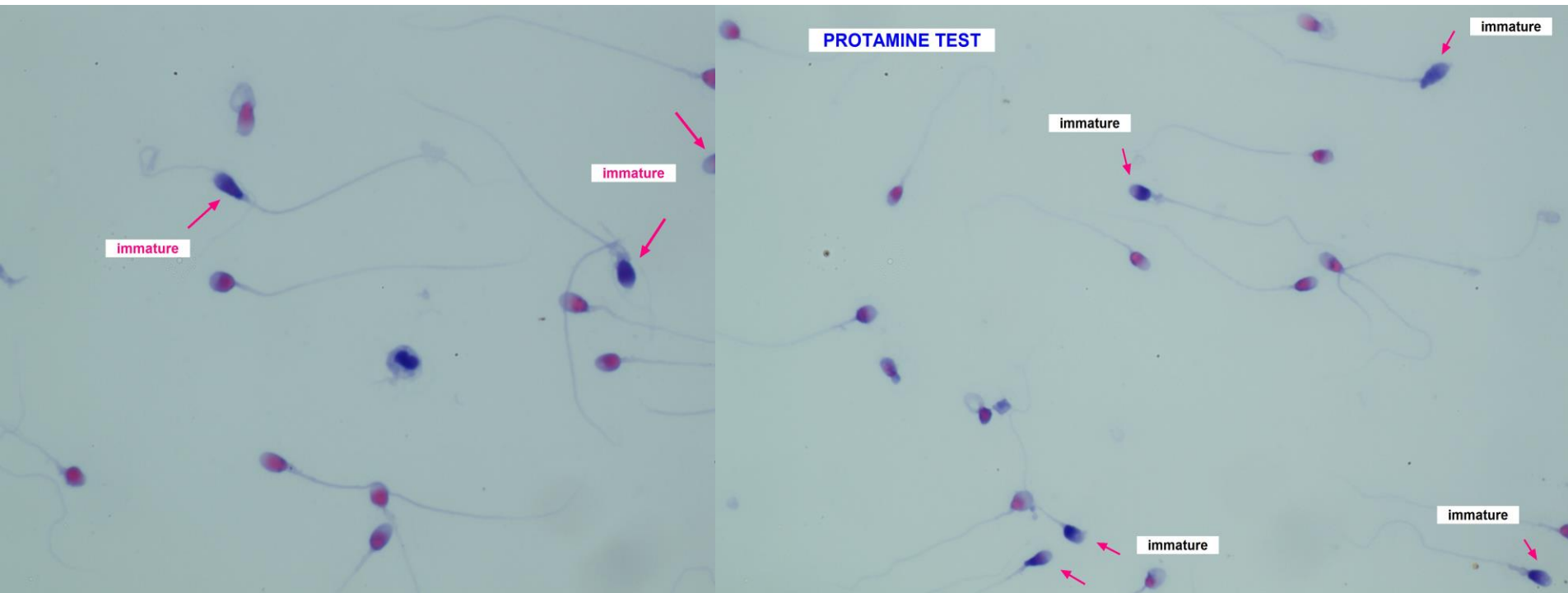


ProtamineSperm

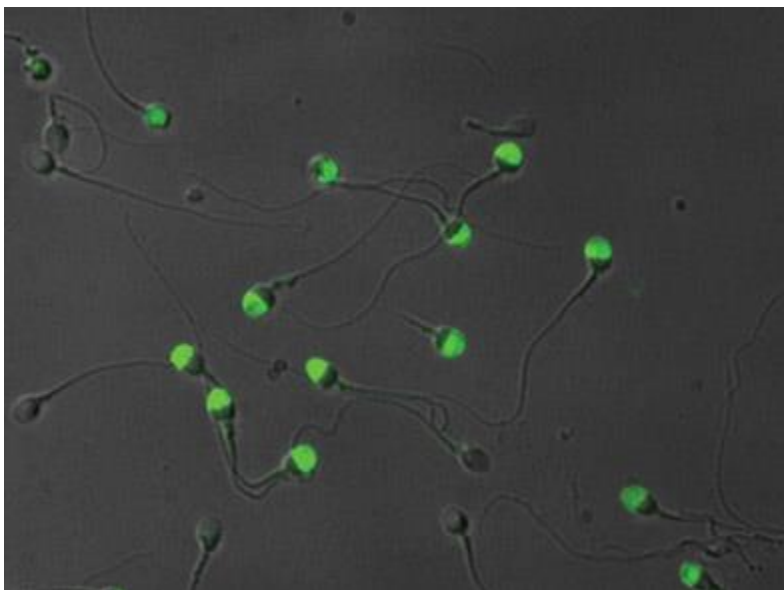
Vyšetrenie obsahu protamínov v jadre spermii

- **Morfológia: teratozoospermia**
- **Idiopatická neplodnosť**

Norma: 15% spermii neobsahujúcich protamíny



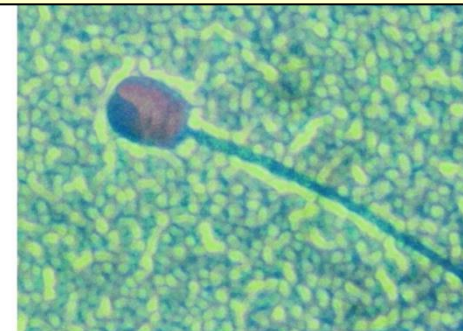
Integrita akrozómu



Normálny akrozóm



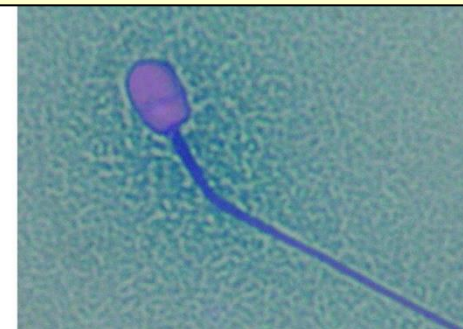
Patologický akrozóm



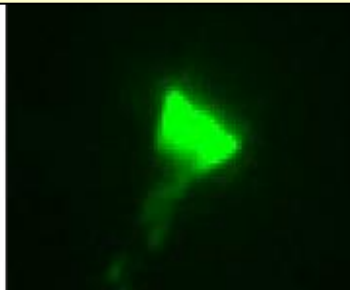
Malý akrozóm



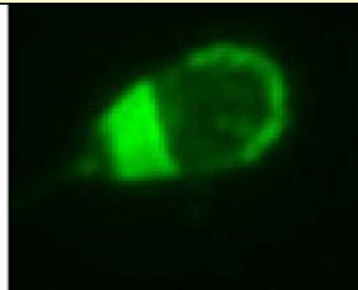
Chýbajúci akrozóm



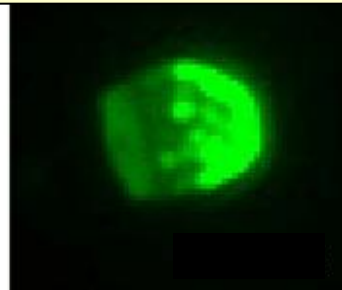
Intaktný akrozóm



Intermediárne poškodenie

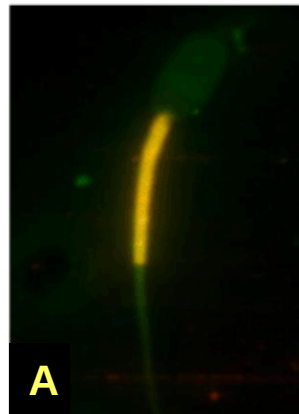


Úplné poškodenie

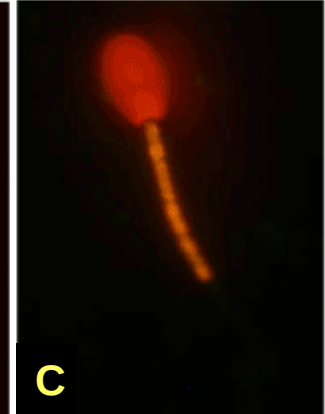
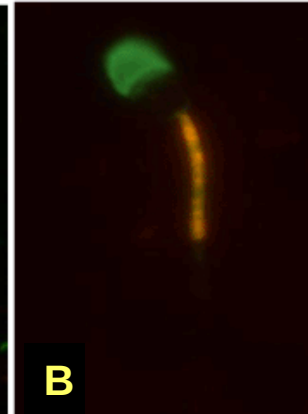


Akrozóm a mitochondriálny membránový potenciál

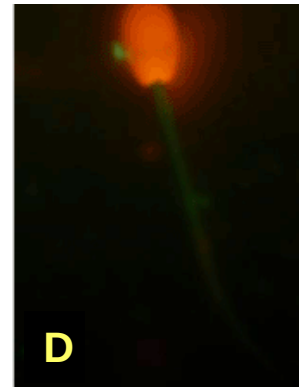
A. Intaktná plazmatická a akrozómová membrána, vysoký mitochondriálny potenciál



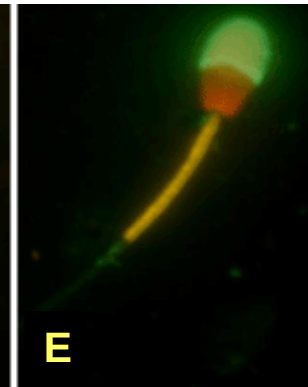
B. Intaktná plazmatická membrána, poškodený akrozóm, vysoký mitochondriálny potenciál



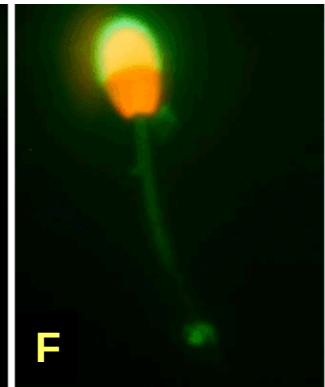
C. Poškodená plazmatická membrána, intaktný akrozóm, vysoký mitochondriálny potenciál



D. Poškodená plazmatická membrána, poškodený akrozóm, nízky mitochondriálny potenciál



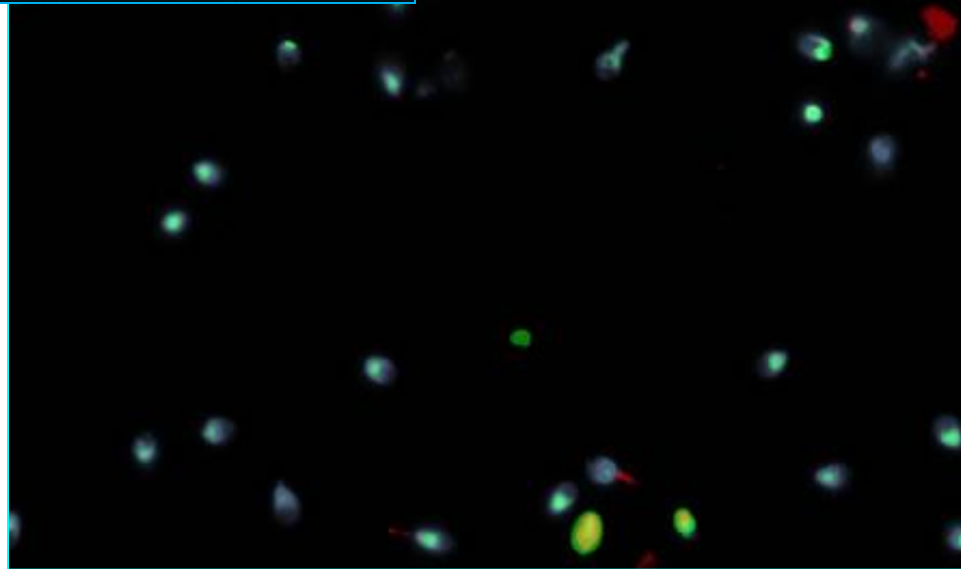
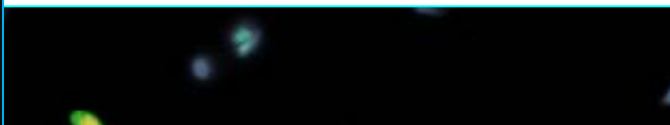
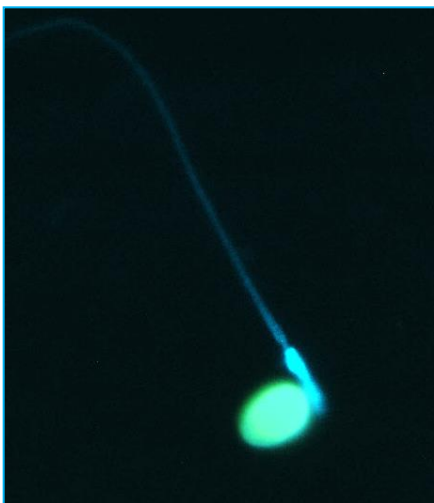
E. Poškodená plazmatická a akrozómová membrána, vysoký mitochondriálny potenciál



F. Poškodená plazmatická a akrozómová membrána, nízky mitochondriálny potenciál

FragmentSperm

Vyšetrenie fragmentácie DNA



Priame hodnotenie poškodenia
ssDNA a dsDNA

TUNEL - fluorescenčná mikroskopia

**NEZÁVISLÝ PROGNOTICKÝ
FAKTOR** pre meranie kvality
spermií vo vzťahu k MUŽSKEJ
FERTILITE

A microscopic image showing numerous sperm cells. The heads of the sperm are stained with a fluorescent dye, appearing in various colors like red, green, and blue, against a dark brown background. Some sperm have long, thin tails visible.

Do 15 % - normálna hladina

> 15 % - IUI

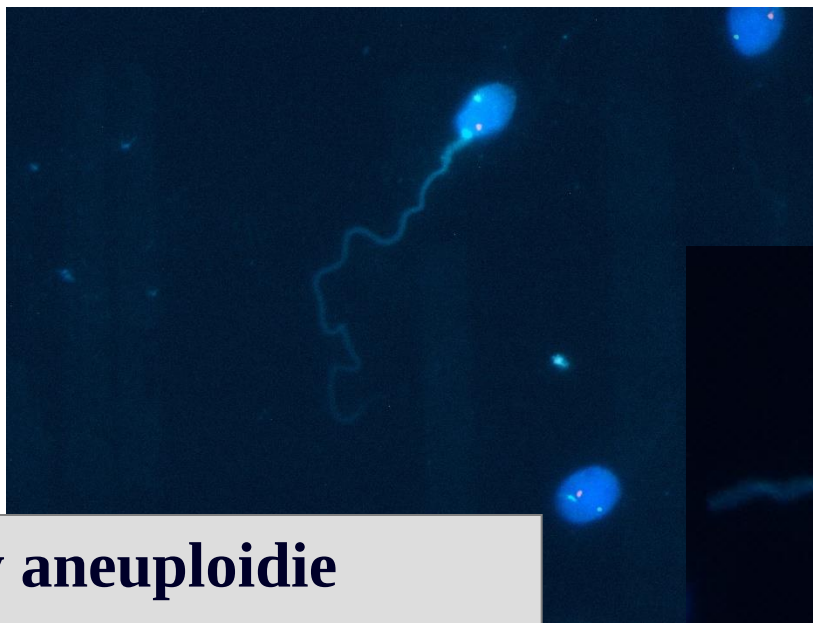
> 20 % - IVF/ICSI

> 30 % - malá pravdepodobnosť

spontánnych gravidít

AneuSperm

FISH vyšetrenie aneuploidie chromozómov



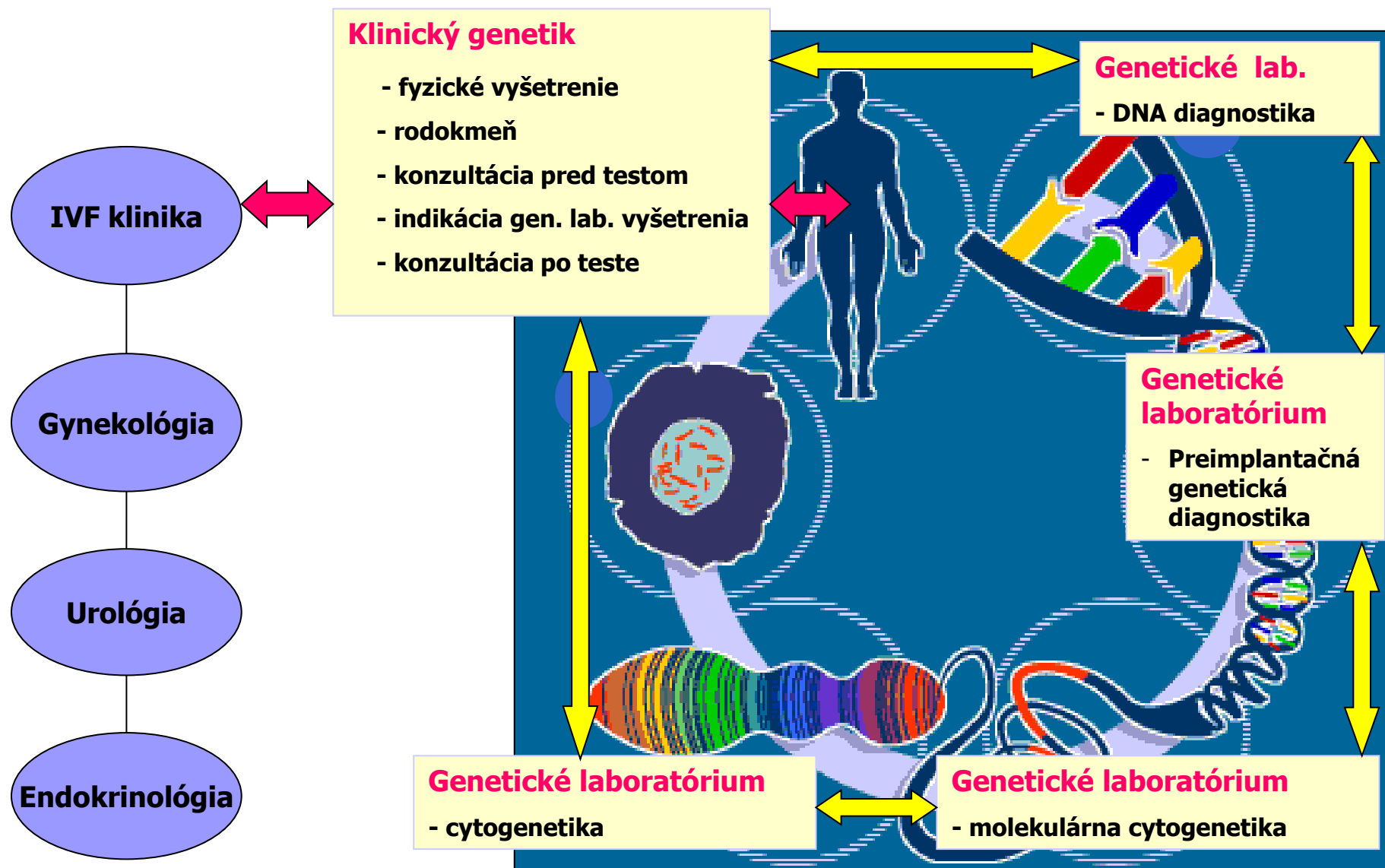
Hodnotenie hladiny aneuploidie

v spermiách - 13, 18, 21, X a Y

- Normálna hladina chr. aneuploidie:

0,2 % /chromozóm

Genetika a neplodnosť'- dialóg medzi odborními



Ďakujeme za pozornosť

Genetické laboratórium ReproGen

Tel: 0948 230 661

www.reprogen.sk

