

ΧΡΗΣΗ ΤΗΣ ΔΝΑΣΗΣ Ι ΓΙΑ ΤΗ ΒΕΛΤΙΩΣΗ ΤΗΣ ΟΞΕΙΔΩΤΙΚΟΥ STRESS ΤΩΝ ΣΠΕΡΜΑΤΟΖΩΑΡΙΩΝ ΣΕ ΣΠΕΡΜΑΤΑ ΠΟΥ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΖΟΝΤΑΙ ΑΠΟ ΥΨΗΛΟ ΙΞΩΔΕΣ.

Νώση Ευφ.^{1,2}, Γκριτζάκης Άγγ.¹, Μακαρούνης Κων.¹, Γεωργούλιας Γεώρ.¹,
Καπετάνιος Βασ.¹, Βενιεράτος Παν.¹, Τσιλιμαντού Αν.¹, Παπανικόπουλος
Χρ.^{1,3}, Ζεγκινιάδου Θεοδ.⁴, Κωνσταντινίδου Αν.², Τσιλιβάκος Βασ.¹

1. ΙΔΙΩΤΙΚΟ ΠΟΛΥΙΑΤΡΕΙΟ LOCUS MEDICUS A.I.E, ΑΘΗΝΑ
2. Α' ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΠΑΘΟΛΟΓΙΚΗΣ ΑΝΑΤΟΜΙΚΗΣ Ε.Κ.Π.Α
3. ΜΟΝΑΔΑ ΥΠΟΒΟΗΘΟΥΜΕΝΗΣ ΑΝΑΠΑΡΑΓΩΓΗΣ "ΕΜΒΡΥΟΓΕΝΕΣΙΣ", ΑΘΗΝΑ
4. ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΑΝΔΡΟΛΟΓΙΑΣ, ΘΕΣΣΑΛΟΝΙΚΗ

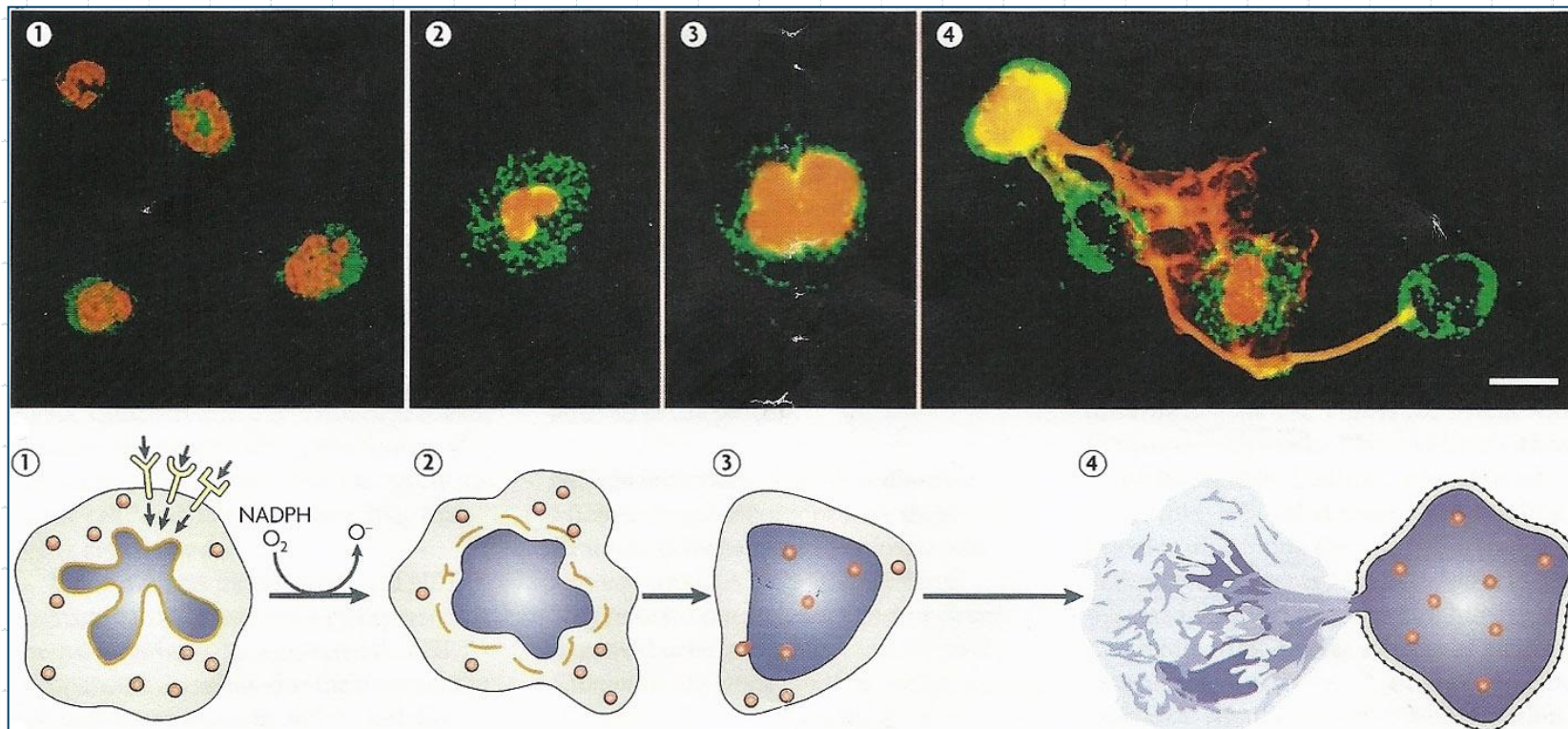


23 09 2012 07:23

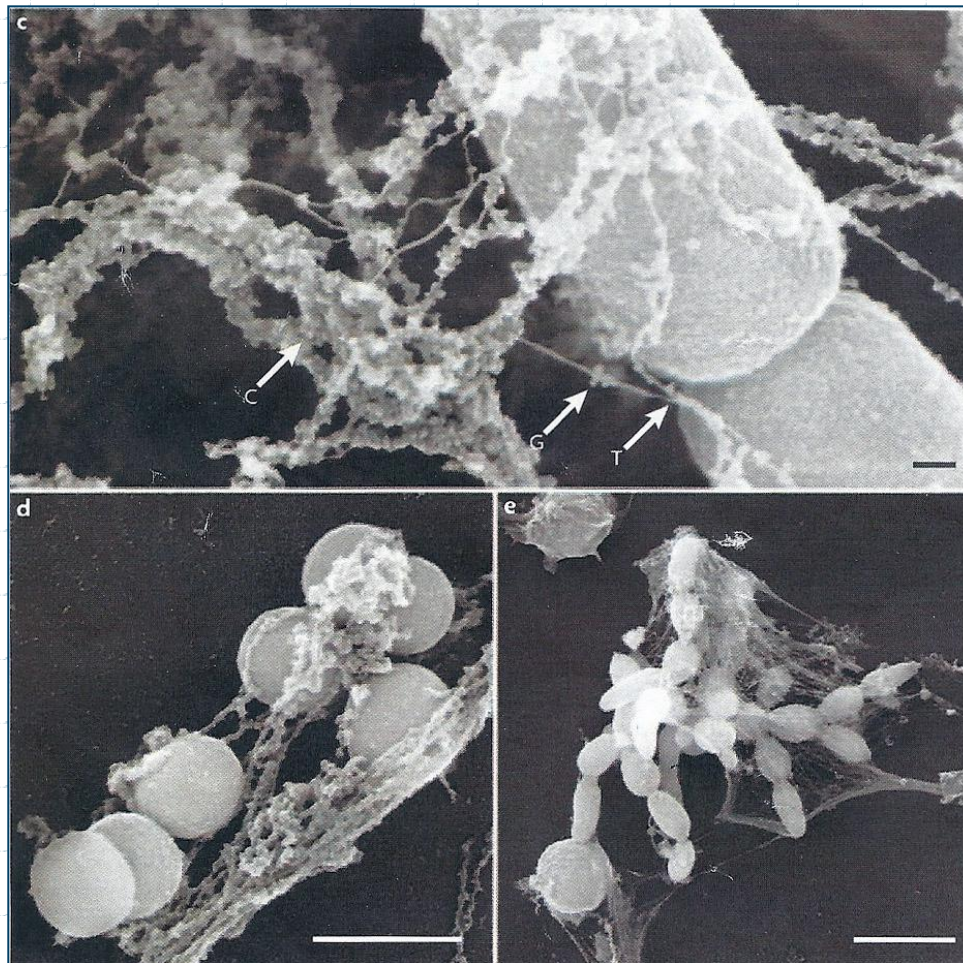
Αυξημένο ιξώδες σπέρματος

- Συχνότητα 12-29%
- Κακή ποιότητα σπέρματος
- Μειωμένη κινητικότητα και χαμηλή απόδοση στις προσπάθειες υποβοηθούμενης αναπαραγωγής
- Συμβάλλει στην ανδρική υπογονιμότητα
- Ενδεχομένως, η παρεμπόδιση των σπερματοζωαρίων στο υπεριξώδες σπερματικό πλάσμα, να οδηγεί σε αυξημένη παραγωγή των ROS (Reactive Oxygen Species - Ενεργές Ρίζες Οξυγόνου).

Ουδετεροφιλικές εξωκυττάριες παγίδες (NETS)



Ουδετεροφιλικές εξωκυττάρειες παγίδες (NETS)



Ερωτήματα υπό διερεύνηση

- ✓ Η παρουσία των NETs στο σπερματικό πλάσμα συμβάλλει στη δημιουργία υψηλού ιξώδους?
- ✓ Αιτιολογική αντιμετώπιση του υψηλού ιξώδους?

Σκοπός :

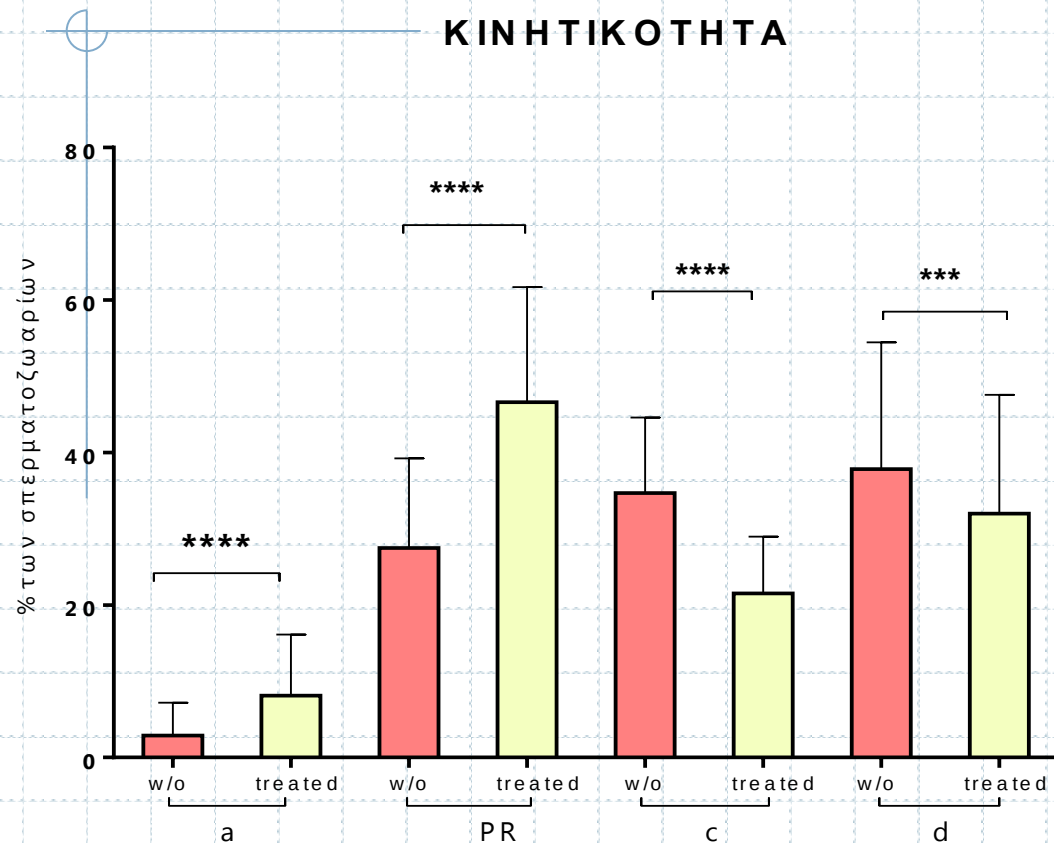
- Υποθέτοντας ότι το εξωκυττάριο DNA που περιέχεται στις ουδετεροφιλικές εξωκυττάριας παγίδες (NETS) συμβάλλει στη δημιουργία υψηλού ιξώδους στο σπέρμα, διερευνήθηκε η ενζυμική πέψη με DNάση I, στοχεύοντας στη βελτίωση των ποιοτικών χαρακτηριστικών των σπερματοζωαρίων.

Υλικό - Μέθοδος

- 24 δείγματα σπέρματος υψηλού και 10 φυσιολογικού ιξώδους επωάστηκαν για 15 min με DNAση I στους 37°C.
- 26 δείγματα σπέρματος υψηλού και 52 φυσιολογικού ιξώδους επεξεργάστηκαν με την τεχνική της φυγοκέντρωσης διαβαθμισμένης πυκνότητας (ΦΔΠ)
- 19 δείγματα σπέρματος υψηλού ιξώδους επεξεργάστηκαν με το συνδυασμό αυτών
- Έγινε μέτρηση της κινητικότητας και της μορφολογίας κατά Tygerberg πριν και μετά την επεξεργασία σύμφωνα με τις οδηγίες WHO, αμέσως μετά τη ρευστοποίηση των δειγμάτων.
- Οι δότες είχαν ιστορικό υπογονιμότητας

Αποτελέσματα

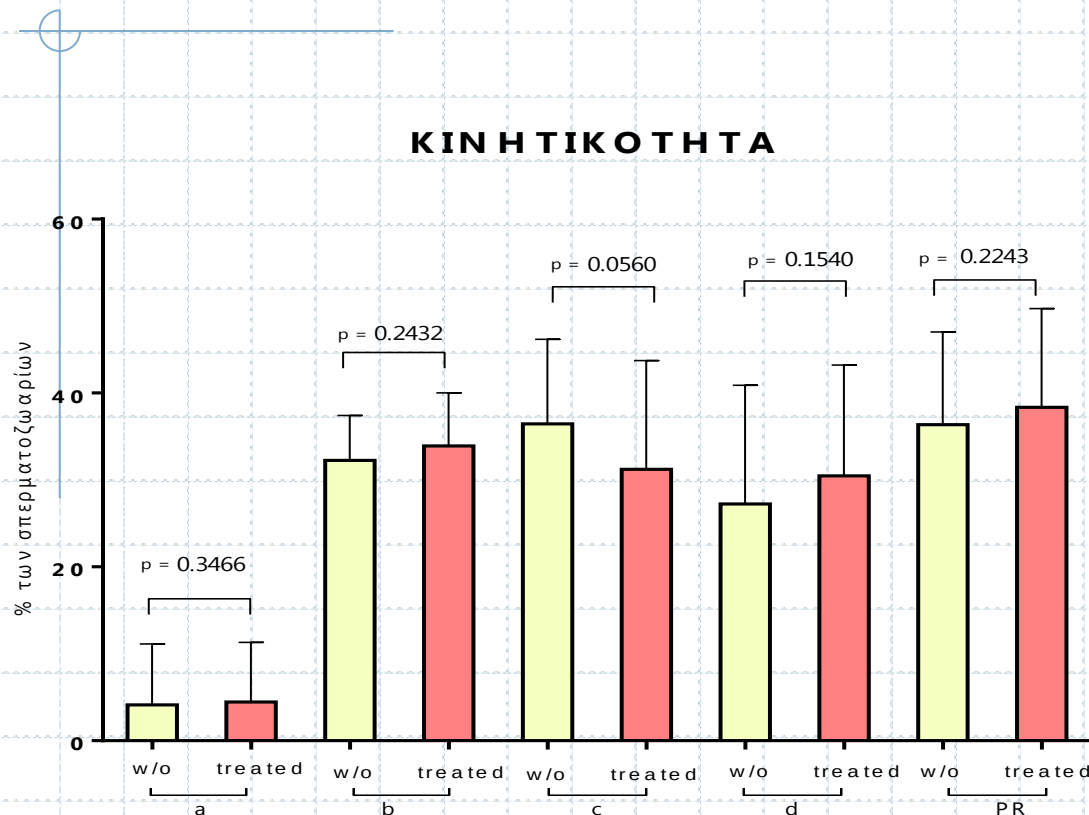
ΚΙΝΗΤΙΚΟΤΗΤΑ



Διαπιστώθηκε αύξηση σε ποσοστό 83% των εξεταζόμενων τόσο της ταχείας (a), όσο και της προωθητικής (a+b, PR) κινητικότητας ($p < 0.0001$, $p < 0.0001$).

15 min κατεργασίας με DNάση I
δειγμάτων υψηλού ιξώδους

Αποτελέσματα

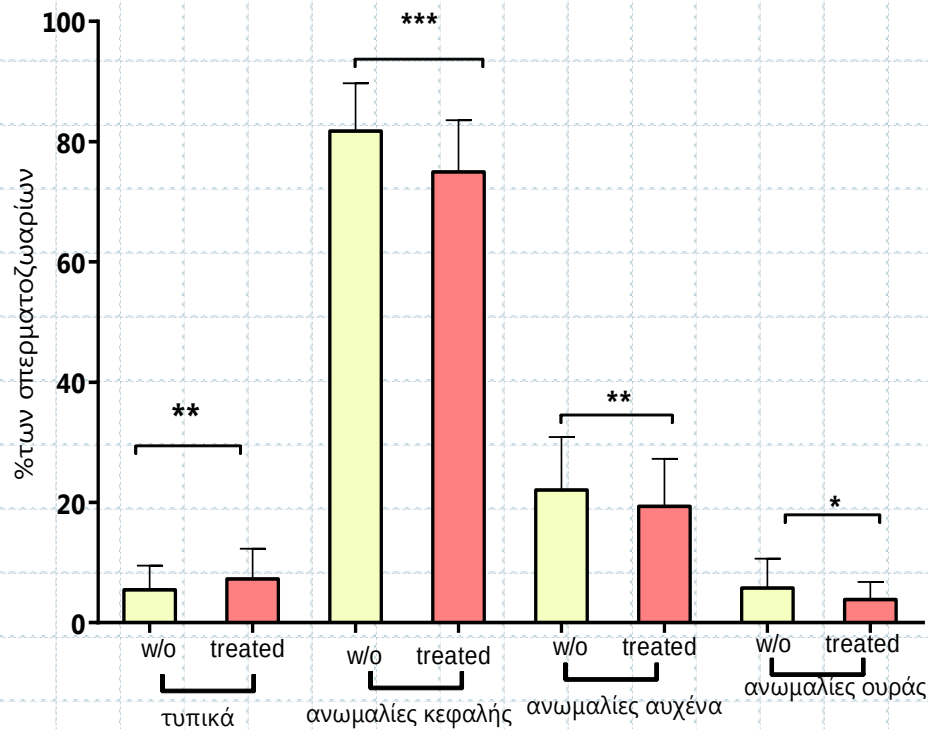


15 min κατεργασία με DNase I
σε δείγματα φυσιολογικού ιξώδους

- Η χρήση DNάσης δεν προκάλεσε καμία μεταβολή της κινητικότητας των σπερματοζωαρίων στο σπέρμα των ανδρών με φυσιολογικό ιξώδες.

- *Η δράση αυτή της DNάσης παρατηρείται αποκλειστικά και μόνο σε σπέρματα υψηλού ιξώδους...*

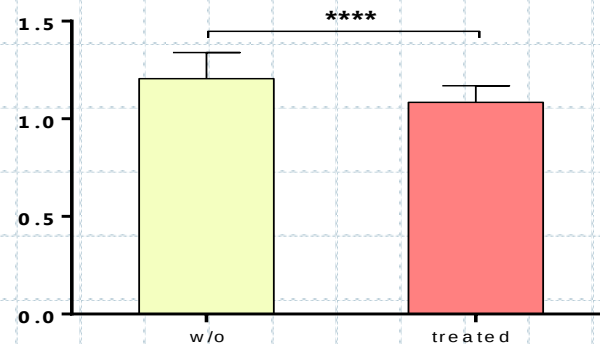
ΜΟΡΦΟΛΟΓΙΑ ΒΥ TYGERBERG



15 min κατεργασία με DNάση I
σε δείγματα υψηλού ιξώδους

Αυξάνονται οι φυσιολογικές μορφές ($p=0.0076$), ενώ ταυτόχρονα μειώνονται οι ανωμαλίες κεφαλής και αυχένα ($p=0.0001$ και $p=0.0066$ αντίστοιχα), καθώς και ο TZI ($p<0.0001$).

ΔΕΙΚΤΗΣ ΤΕΡΑΤΟΣΠΕΡΜΙΑΣ (TZI)

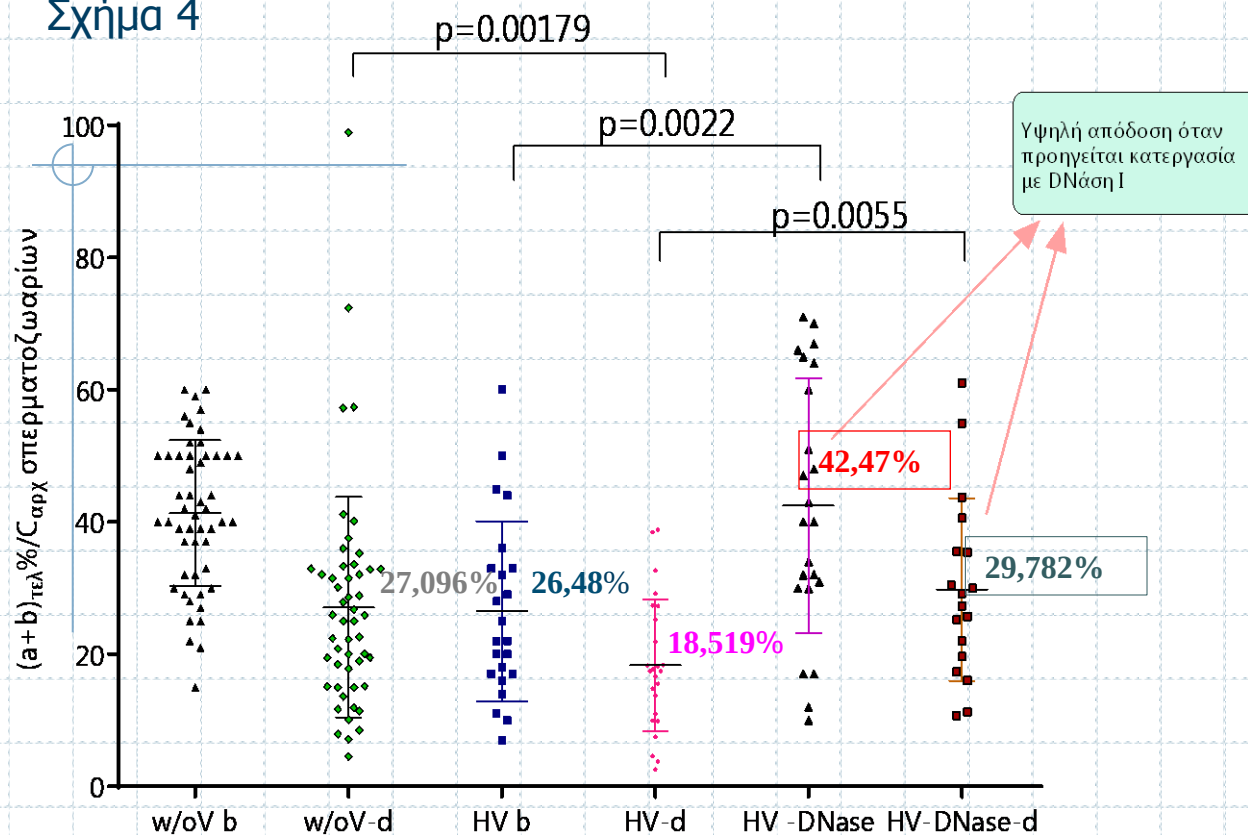


15 min κατεργασία με DNase I
σε δείγματα υψηλού ιξώδους

Σχήμα 5

Απόδοση μεθόδων

Σχήμα 4



w/oV-b: σπέρματα χωρίς ιξώδες πριν τη φυγοκέντρηση με βαθμιδωτή πυκνότητα.
w/oV-d: σπέρματα χωρίς ιξώδες μετά τη φυγοκέντρηση με βαθμιδωτή πυκνότητα.
HV b: σπέρματα υψηλού ιξώδους πριν τη φυγοκέντρηση με βαθμιδωτή πυκνότητα.
HV-d: σπέρματα υψηλού ιξώδους μετά τη φυγοκέντρηση με βαθμιδωτή πυκνότητα.
HV-DNase: σπέρματα υψηλού ιξώδους μετά την κατεργασία με DNάση και
HV-DNase-d: σπέρματα υψηλού ιξώδους μετά την κατεργασία με DNάση και
 ακόλουθη φυγοκέντρηση βαθμιδωτής πυκνότητας.

Επί του συνόλου των σπερματοζωαρίων της εκσπερμάτισης ύστερα από εμπλουτισμό, η απόδοση των σπερματοζωαρίων με PR κίνηση σε σπέρματα φυσιολογικού ιξώδους είναι 27,096%, ενώ η αντίστοιχη απόδοση σε σπέρματα υψηλού ιξώδους είναι 18,519% ($p=0,00179$). Μετά από κατεργασία με DNάση I σπερμάτων υψηλού ιξώδους, παρατηρήθηκε αύξηση της απόδοσης από 26,48% πριν, σε 42,47% ($p=0,0022$). Ο συνδυασμός των δύο, στα σπέρματα υψηλού ιξώδους έχει ως αποτέλεσμα απόδοση ίση με 29,782%, διαφέροντας σημαντικά από το 18,519% ($p=0,0055$) όπου δεν είχε προηγηθεί κατεργασία με DNάση. Έτσι, πλησιάζεται η απόδοση της απλής διαδικασίας εμπλουτισμού στα σπέρματα με φυσιολογικό ιξώδες (27,096%)

ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑ

Με βάση την εργασία αυτή το υψηλό ιξώδες στο σπέρμα αποδίδεται στην παρουσία των NETs.

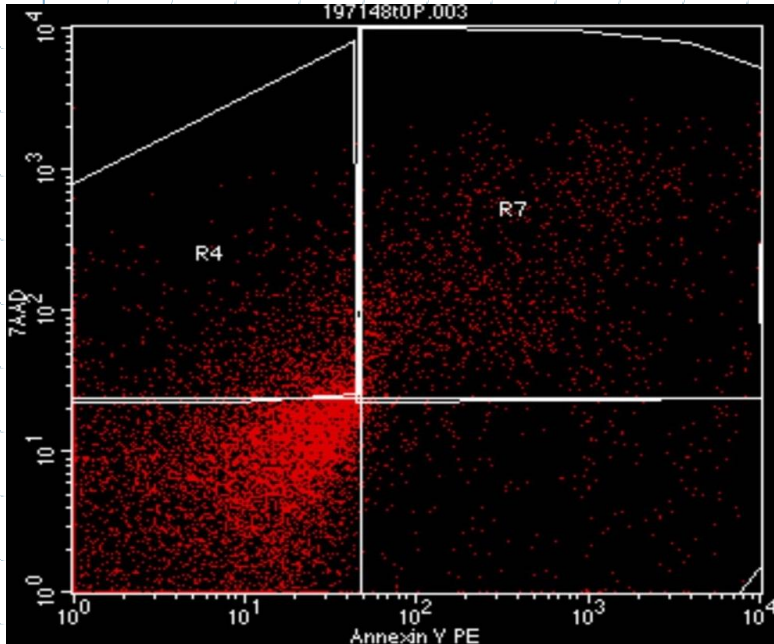
Η κατεργασία των σπερμάτων υψηλού ιξώδους με DNάση, βελτιώνει σημαντικά την κινητικότητα και τη μορφολογία των σπερματοζωαρίων.

Πρόκειται για την πρώτη μελέτη παγκοσμίως που αποδίδει το τόσο σημαντικό πρόβλημα του ιξώδους στην παρουσία των NETs και προτείνει σαφή αιτιολογική αντιμετώπιση*.

*ΚΑΤΑΘΕΣΗ ΔΙΠΛΩΜΑΤΟΣ ΕΥΡΕΣΙΤΕΧΝΙΑΣ ΜΕ ΑΡ. ΑΙΤΗΣΗΣ:
ΔΕ 20140100297/23.052014

ΑΝΙΧΝΕΥΣΗ ΑΠΟΠΤΩΤΙΚΩΝ ΚΥΤΤΑΡΩΝ

- **Απόπτωση:** προγραμματισμένος κυτταρικός θάνατος
- **Ανεξίνη V:** πρωτεΐνη με μεγάλη τάση σύνδεσης με τη φωσφατιδυλοσερίνη(PS) που έχει μετατοπιστεί στην εξωτερική πλευρά της κυτταρικής μεμβράνης στην έναρξη της απόπτωσης. Προσθήκη φθορίζουσας χρωστικής PE (φυκοερυθρίνη) → ανίχνευση και ποσοτικός προσδιορισμός αποπτωτικών κυττάρων.
- **7-αμινο-ακτινομυκίνη D(7-AAD):** χρωστική που χρησιμοποιείται ως δείκτης βιωσιμότητας-διαχωρισμός πρώιμων από όψιμα αποπτωτικά κύτταρα
- Η ταυτόχρονη χρώση με ανεξίνη-PE και 7-AAD → διάκριση τεσσάρων διαφορετικών πληθυσμών:



1. Ζωντανά, μη αποπτωτικά (Annexin-7AAD-)
2. Πρώιμα αποπτωτικά (Annexin+7AAD-)
3. Όψιμα αποπτωτικά (Annexin+7AAD+)
4. Νεκρά (Annexin-7AAD+)

Προσέγγιση στη Διερεύνηση της Υπογονιμότητας

Άγνωστης Αιτιολογίας: Σπέρμα

Εξέταση απόπτωσης με τη μέθοδο Ανεξίνης-Φωσφατίδουλοσερίνης

Τα αποτελέσματα εκ του συνόλου των σπερματοζωαρίων έχουν ως εξής:

- Ζωντανά, Μη αποπτωτικά [Annexin(-), Μembrάνη μη διαπερατή]: **80,27%**
- Πρώιμα αποπτωτικά [Annexin(+), Μembrάνη μη διαπερατή]: **6,07%**
- Όψιμα αποπτωτικά [Annexin(+), Μembrάνη διαπερατή]: 7,04%
- Λοιπά Νεκρά [Annexin(-), Μembrάνη διαπερατή]: 6,62%

**Με την εφαρμοζόμενη μέθοδο όλες οι κατηγορίες, πλην της πρώτης, βρίσκονται σε μη αντιστρεπτή διαδικασία υποστροφής.*

Προσέγγιση στη Διερεύνηση της Υπογονιμότητας

Άγνωστης Αιτιολογίας: Σπέρμα

Εξέταση απόπτωσης με τη μέθοδο Ανεξίνης-Φωσφατίδυλοσερίνης

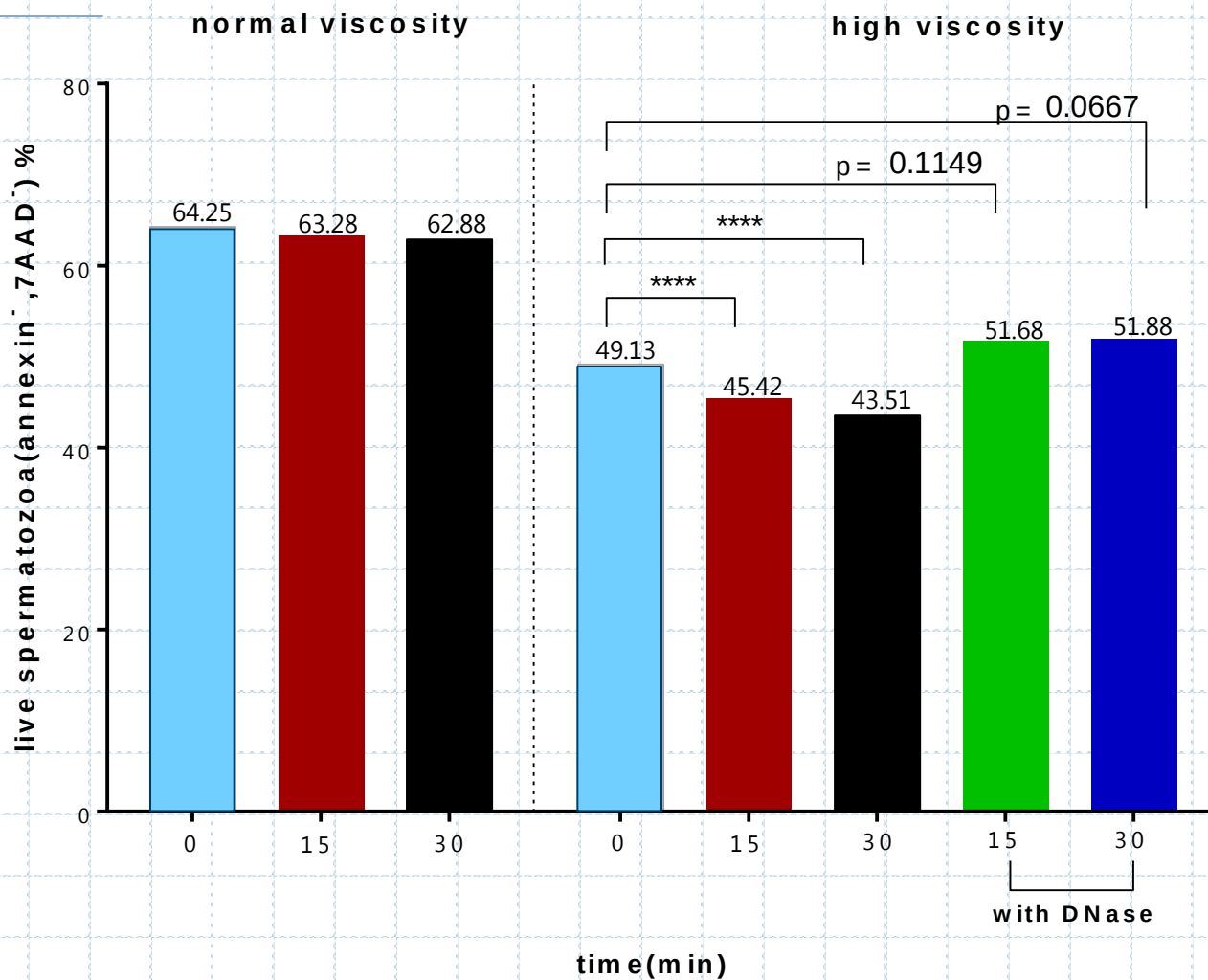
Τα αποτελέσματα εκ του συνόλου των σπερματοζωαρίων έχουν ως εξής:

- Ζωντανά, Μη αποπτωτικά [Annexin(-), Μembrάνη μη διαπερατή]: **48,88%**
- Πρώιμα αποπτωτικά [Annexin(+), Μembrάνη μη διαπερατή]: **25,20%**
- Όψιμα αποπτωτικά [Annexin(+), Μembrάνη διαπερατή]: 20,42%
- Λοιπά Νεκρά [Annexin(-), Μembrάνη διαπερατή]: 5,50%

**Με την εφαρμοζόμενη μέθοδο όλες οι κατηγορίες, πλην της πρώτης, βρίσκονται σε μη αντιστρεπτή διαδικασία υποστροφής.*

ΕΠΙΔΡΑΣΗ DNAσης ΣΤΗΝ ΑΠΟΠΤΩΣΗ ΣΠΕΡΜΑΤΟΣ

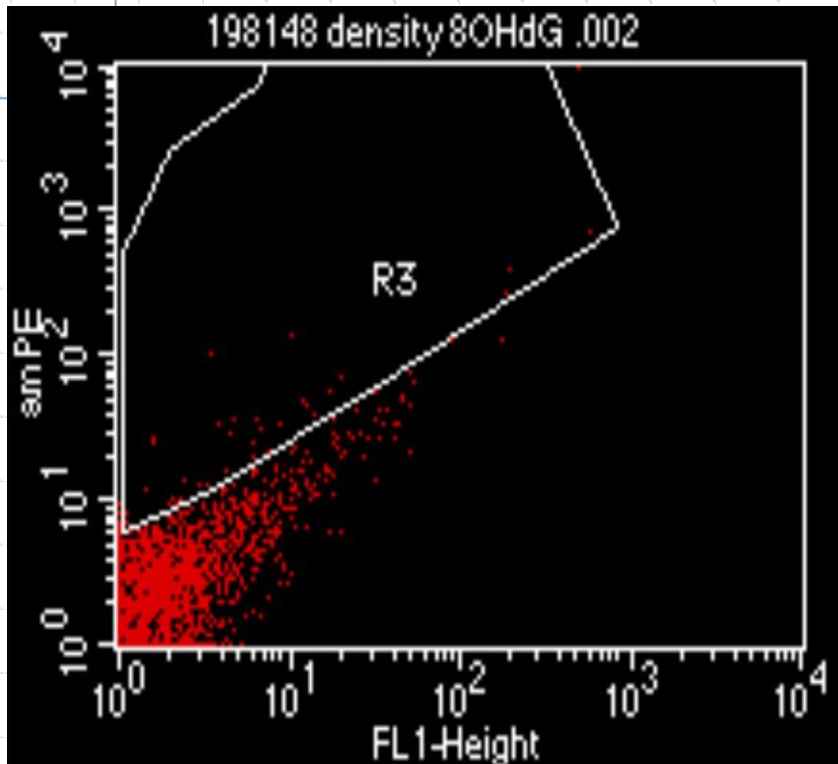
ANNEXIN - VISCOSITY



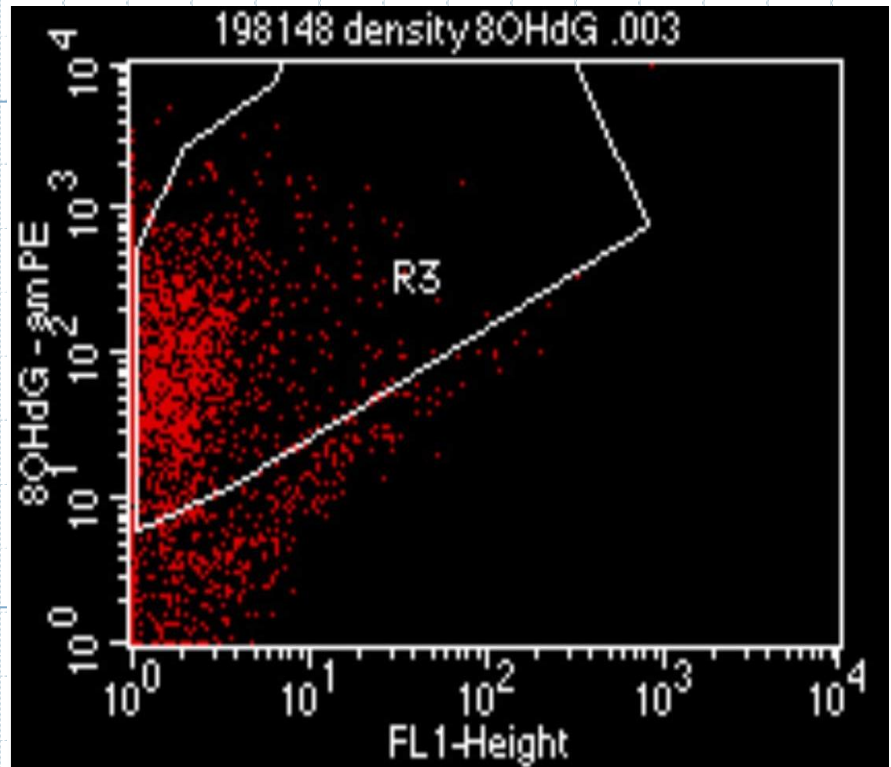
ΜΕΤΡΗΣΗ ΤΟΥ ΟΞΕΙΔΩΤΙΚΟΥ STRESS

- Δείκτης οξείδωσης DNA: ανίχνευση και ποσοτικοποίηση του νουκλεοτιδίου 8 υδροξυ-2-δεσοξυγουανωσίνη(8OHdG) συζευγμένο με amPE, με κυτταρομετρία ροής

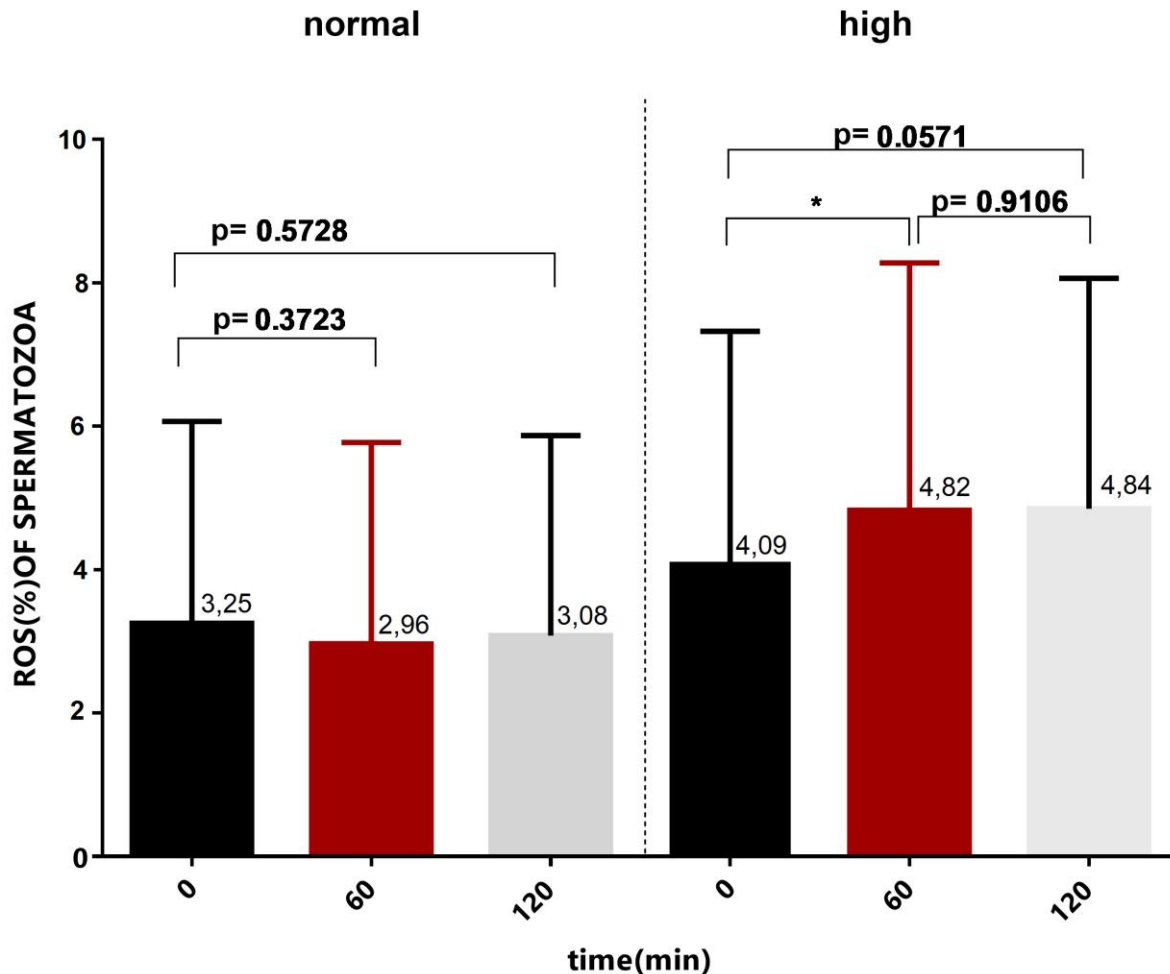
control



test



ΣΥΣΧΕΤΙΣΗ ΙΞΩΔΟΥΣ ΜΕ ΟΞΕΙΔΩΣΗ ΤΟΥ DNA ΣΠΕΡΜΑΤΟΣ ROS - VISCOSITY

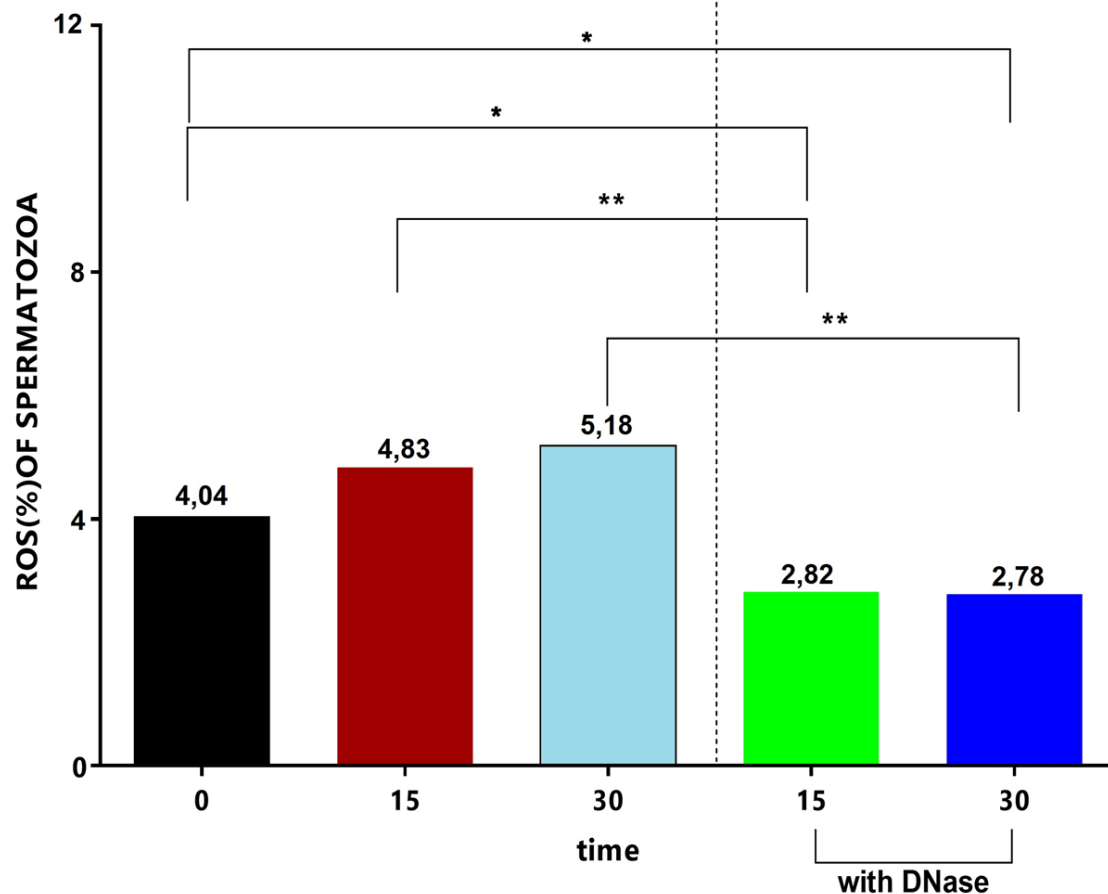


- Σε περίπτωση **φυσιολογικού** ιξώδους δεν παρατηρείται στατιστικά σημαντική διαφορά στα ROS.
- Σε περίπτωση **υψηλού** ιξώδους παρατηρείται στατιστικά σημαντική αύξηση μόνο την 1h, ενώ στη συνέχεια σταθεροποιείται το ποσοστό των ROS.

ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΔΝάσης ΣΤΗΝ ΟΞΕΙΔΩΣΗ ΣΠΕΡΜΑΤΟΣ

ROS - VISCOSITY

high viscosity t0-t15-t30



- Σε περίπτωση **υψηλού** ιξώδους παρατηρείται στατιστικά σημαντική μείωση των ROS μετά από επώαση με ΔΝάση τόσο στα 15 όσο και στα 30 min, όπου και σταθεροποιείται.

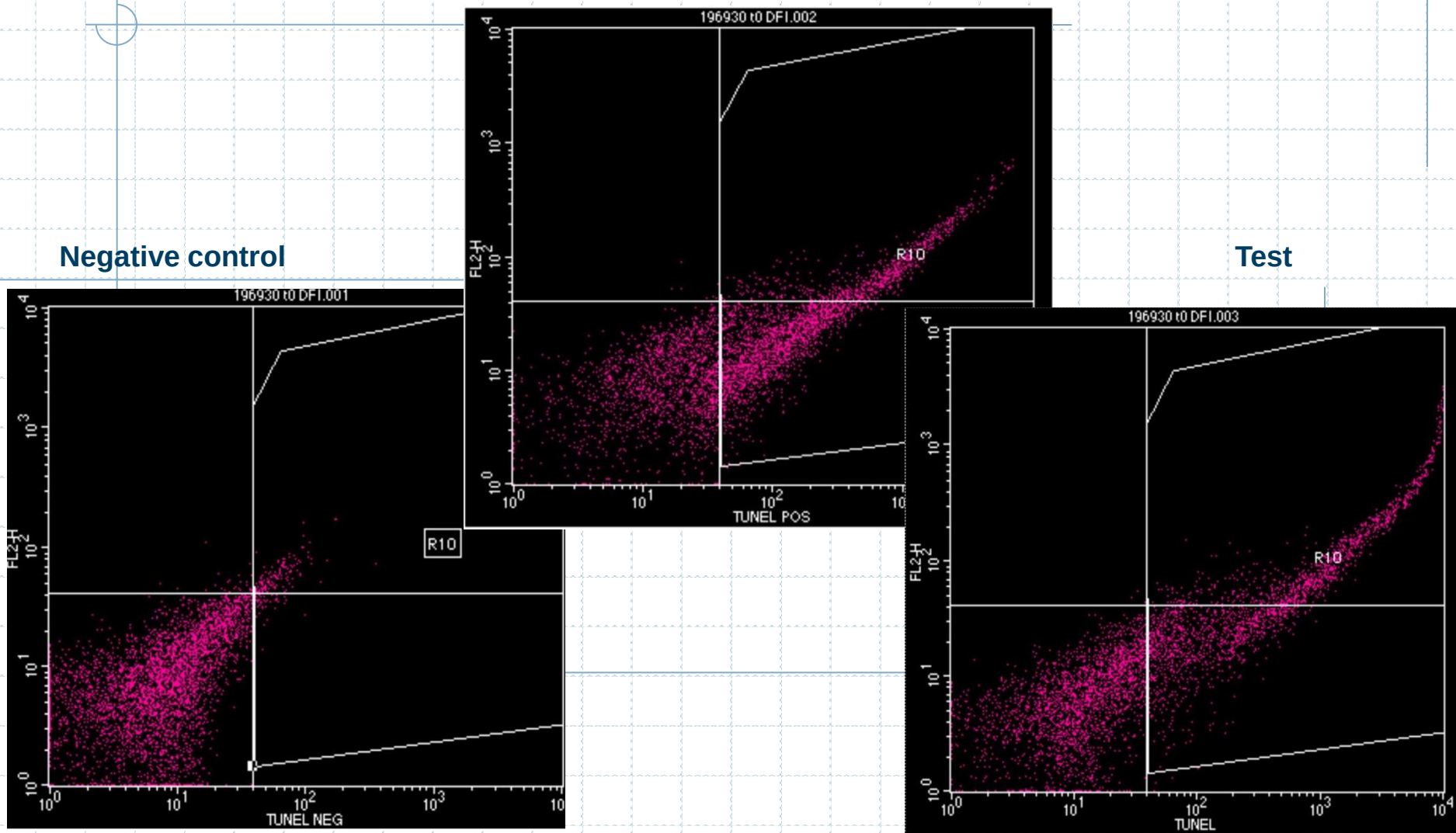
ΜΕΤΡΗΣΗ ΤΟΥ ΚΑΤΑΚΕΡΜΑΤΙΣΜΟΎ ΤΟΥ DNA

Tunel με κυτταρομετρία ροής

Positive control

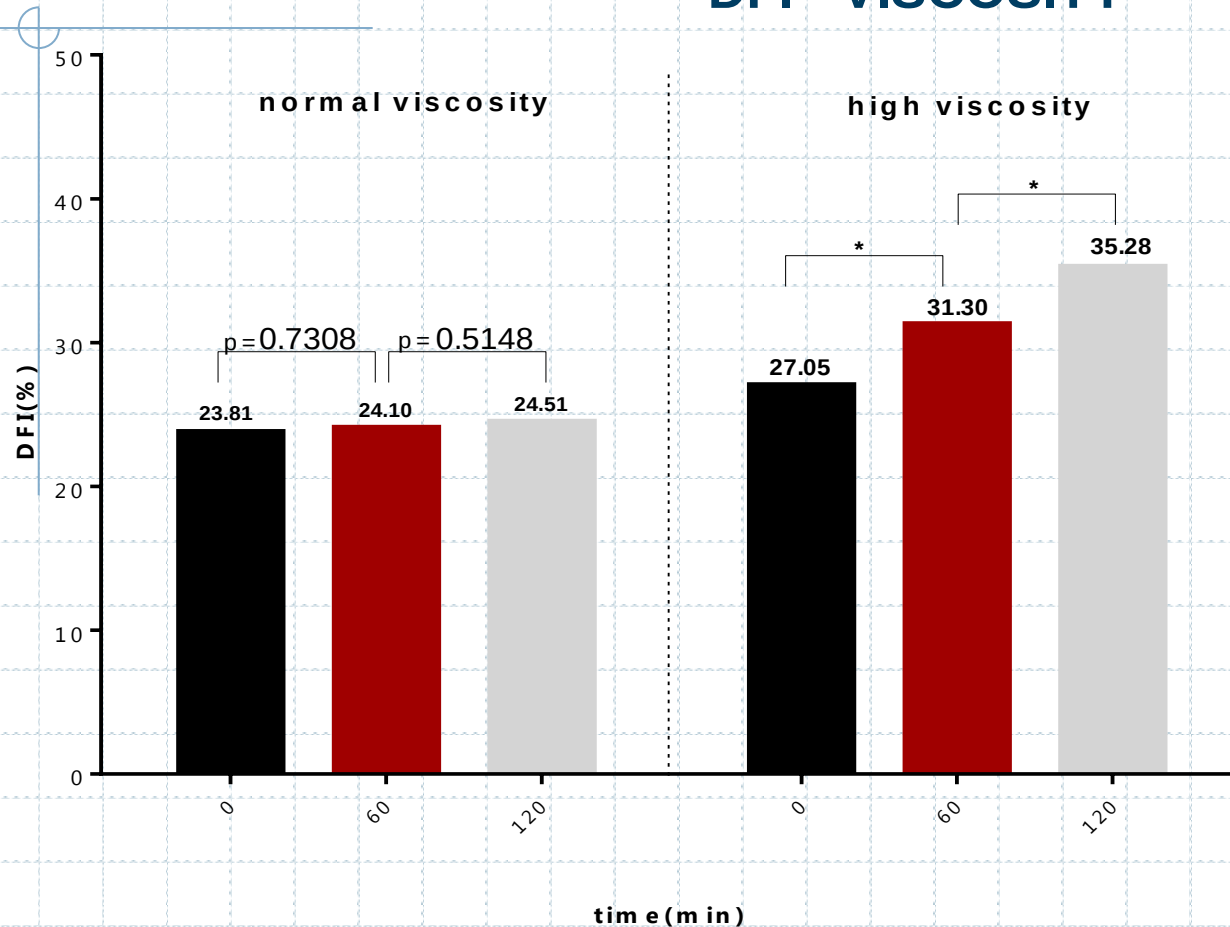
Negative control

Test



ΣΥΣΧΕΤΙΣΗ ΙΞΩΔΟΥΣ ΜΕ ΚΑΤΑΚΕΡΜΑΤΙΣΜΟ ΤΟΥ DNA ΣΠΕΡΜΑΤΟΣ

DFI - VISCOSITY

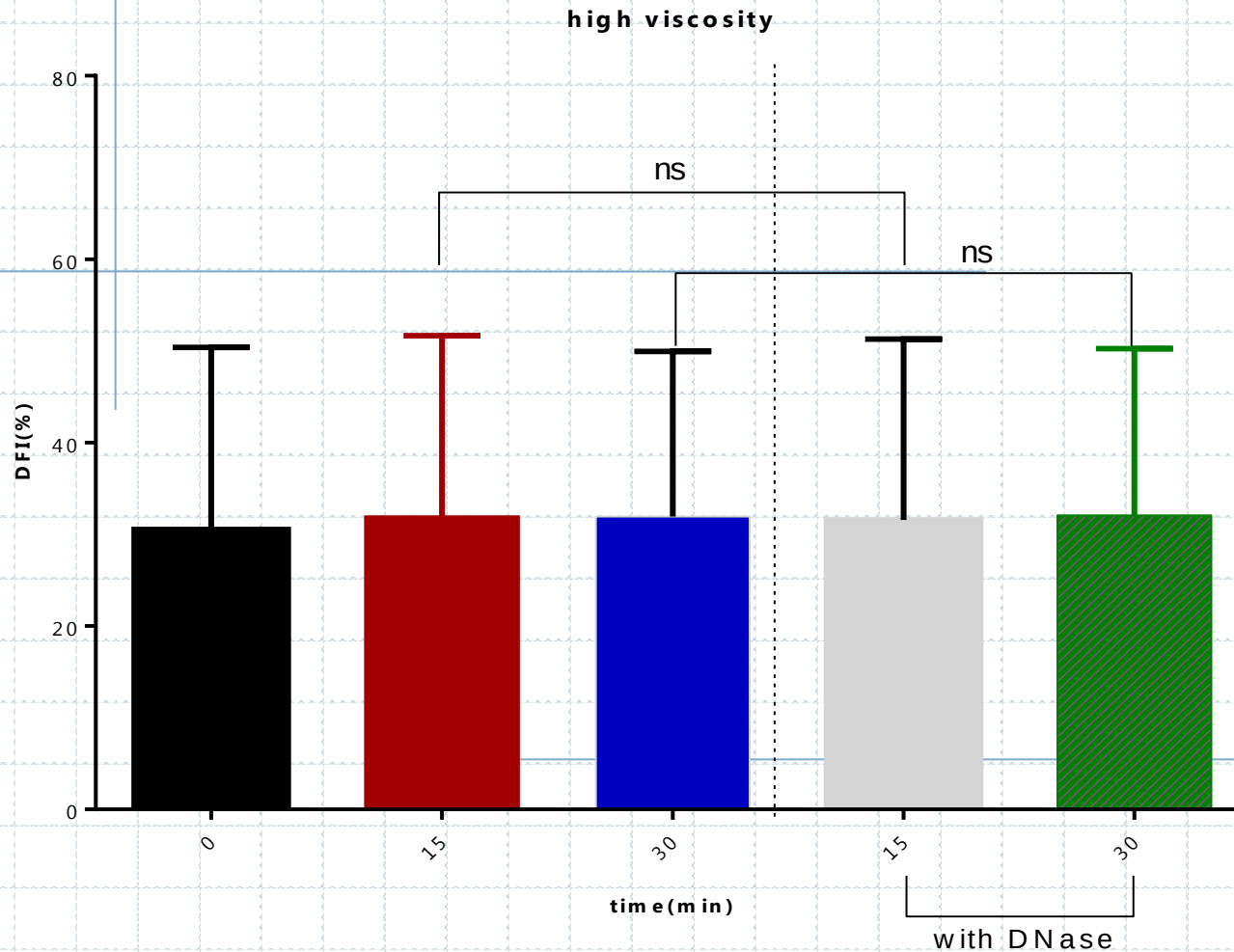


- Σε περίπτωση **φυσιολογικού** ιξώδους δεν παρατηρείται στατιστικά σημαντική διαφορά στο DFI.
- Σε περίπτωση **υψηλού** ιξώδους παρατηρείται στατιστικά σημαντική αύξηση στο DFI τόσο την 1h όσο και στις 2h.

- Εκτιμάται ότι τα ROS είναι υπεύθυνα για περίπου 10.000 μετατροπές βάσεων DNA /κύτταρο /ημέρα..... (Finkel T. et al,2003)

ΕΠΙΔΡΑΣΗ DNάσης ΣΤΟΝ ΚΑΤΑΚΕΡΜΑΤΙΣΜΟ ΤΟΥ ΣΠΕΡΜΑΤΟΣ

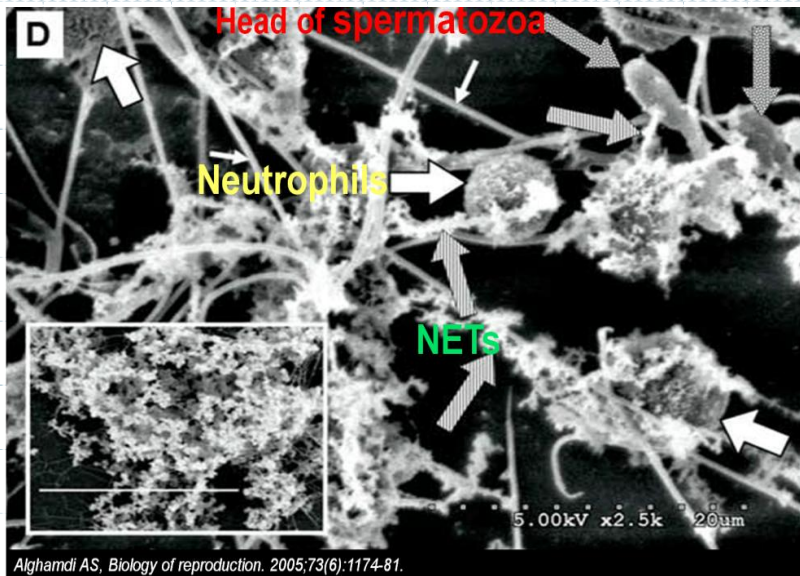
DFI - VISCOSITY



➤ Δεν παρατηρείται στατιστικά σημαντική διαφορά στο DFI μετά την επώαση με DNάση στα 15 και 30 min.

Συζήτηση

- Η δράση της DNάσης επί των NETs είναι γνωστή βιβλιογραφικά αλλά και προφανής αφού το κύριο συστατικό τους είναι το DNA.
- Η χρήση της DNάσης I εφαρμόζεται ήδη, κυρίως μέσω εισπνοών στην αντιμετώπιση της κυστικής ίνωσης (*Marcin Zawrotniak et al, 2013*).
- Το ένζυμο αυτό αποτελεί φυσιολογικό συστατικό του σπερματικού πλάσματος και η απουσία ή ελαττωμένη δραστηριότητα της DNάσης, σχετίζεται με δυσμενή αποτελέσματα επί των σπερματεγχύσεων σε άλλα ανώτερα θηλαστικά (*Alghamdi et al. 2005, 2010*).
- Από το 2005 έχει προταθεί ότι η ενδογενής DNάση του σπέρματος βοηθά στον απεγκλωβισμό των σπερματοζωαρίων από τα NETs που δημιουργούνται στον κόλπο της γυναίκας ως συνέπεια των εκεί φλεγμονών (*Alghamdi et al, 2005*).



Σκόπιμη κρίνεται η κατεργασία με DNAase για 15min πριν από τον εμπλουτισμό στις προσπάθειες υποβοηθούμενης αναπαραγωγής, αφού αποτρέπει τον ρυθμό απόπτωσης και τις αλλοιώσεις του DNA λόγω υπεροξειδωσης.



23.09.2012 07:17