

Gdański Uniwersytet Medyczny



mgr Ewa Pastuszek

**Ocena wpływu stopnia fragmentacji DNA plemników na płodność mężczyzn.
Porównanie dwóch metod badawczych: TUNEL i Comet assay.**

**Evaluation of the effects sperm DNA fragmentation on male fertility.
A comparison of two methods: TUNEL and Comet assay.**

Rozprawa doktorska

Promotor pracy:

prof. dr hab. Krzysztof Łukaszuk

Promotor pomocniczy:

dr Jolanta Kiewisz

**Zakład Pielęgniarstwa Położniczo-Ginekologicznego
Katedra Pielęgniarstwa**

Gdańsk 2018

Streszczenie w języku polskim

Dane WHO wykazują, że problem niepłodności dotyczy ok. 15-20% par w na świecie z czego aż w ok. 45% przypadków niepłodność wynika z czynnika męskiego. Najczęściej spotykaną przyczyną męskiej niepłodności jest niska jakość nasienia związana z obniżoną koncentracją, ruchliwością lub morfologią. Jednak w ok. 10-20% przypadków etiologia niepłodności pozostaje niewyjaśniona.

Na jakość nasienia wpływa bardzo dużo czynników i niestety nie jest możliwe wskazanie jednego głównego. Zaburzenia te powodowane są przez przebyte choroby (wirusowe lub bakteryjne zapalenia układu moczowo płciowego, nowotwory), urazy, przyjmowane leki, używki, czynność hormonalną oraz zaburzenia genetyczne.

Badanie nasienia, obok badania andrologicznego i wywiadu klinicznego, jest podstawowym narzędziem oceny czynnika męskiego niepłodności. Badanie ogólne nasienia polega na analizie próbki ejakulatu pod kątem istotnych parametrów makro i mikroskopowych takich jak: objętość, pH, czas aglutynacji, koncentracja plemników, ruchliwość, żywotność, obecność leukocytów i morfologia. Słaba wartość predykcyjna obecnie stosowanych podstawowych testów seminologicznych może wynikać z braku oceny stanu integralności plemnikowego DNA.

Materiał genetyczny obecny w plemnikach jest zabezpieczony przed uszkodzeniami na wiele sposobów ale skuteczność tej ochrony bywa często upośledzona. Szacuje się, iż u prawie 20% pacjentów z idiopatyczną niepłodnością wynika to z podwyższonego poziomu fragmentacji plemnikowego DNA. Brak mechanizmów naprawczych w dojrzałych plemnikach powoduje, że badanie fragmentacji DNA plemnika może być wyznacznikiem jakości materiału genetycznego oraz prognostycznym wskaźnikiem skuteczności zapłodnienia, rozwoju ciąży i urodzenia dziecka.

Metody oceny fragmentacji DNA możemy podzielić na dwa typy. Pierwszy obejmuje metody wykrywające pęknięcia DNA, które zachodzą w sposób naturalny lub losowy w cząsteczce DNA (TUNEL oraz Comet assay (wariant neutralny)). Drugi rodzaj technik obejmuje testy, które mierzą podatność chromatyny na denaturację w określonych warunkach (SCSA oraz Comet assay (wariant zasadowy)).

Cykl prac poświęcony jest wpływowi różnych czynników takich jak np.: nosicielstwo translokacji czy morfologia plemników na wyniki badania nasienia ze szczególnym uwzględnieniem stopnia fragmentacji DNA oraz powodów trudności w interpretacji wyników badań dotyczących metod rozrodu wspomaganego.

Zwiększone prawdopodobieństwo wykrycia aberracji u pacjenta z obniżoną liczną plemników w nasieniu jest opisywane przez wielu autorów. Jednak z reguły badania nie skupiają się na porównaniu innych parametrów, a jeśli już to porównywane są z parametrami dawców. W swoim badaniu postanowiłam zastosować inne podejście i porównać nosicieli translokacji do losowo wybranych mężczyzny z prawidłowym kariotypem. Pod względem koncentracji, ruchliwości i żywotności plemników grupa nosicieli translokacji wzajemnych nie różniła się istotnie statystycznie od grupy kontrolnej. Natomiast nosiciele translokacji Robertsonowskich, mieli najniższe parametry. W badanych grupach nie wykazałam jednak statystycznie istotnych różnic w poziomie fragmentacji DNA plemników.

Zarówno przegląd piśmiennictwa dotyczącego metod wspomaganego rozrodu, jak również badania własne, nie pozwalają na wysnucie jednoznacznych wniosków. Część z wątpliwości związanych z rozbieżnością w wynikach badań wynika z niezajomości podstawowych zasad optyki. Autorzy publikacji naukowych powinni być zobligowani do podawania parametrów, niezbędnych do obliczenia realnego powiększenia mikroskopu i uzyskanej rozdzielczości stosowanej podczas procedury wyboru plemnika przed procedurą zapłodnienia. Pozwoli to wyeliminować przynajmniej część wątpliwości związanych z rozbieżnością w wynikach badań.

Kliniczne znaczenie przeprowadzania badań morfologii plemników jest wciąż dyskusyjne. Niektóre badania pokazują, że dokładny pomiar parametrów morfologicznych odgrywa istotną rolę w określaniu męskiej płodności. Celem kolejnego badania było określenie związku między uszkodzeniami DNA a obecnością w plemnikach wakuoli. Prawidłowa morfologia i mniej wakuoli w główce plemnika koreluje z niższym stopniem fragmentacji jego DNA. Jednak, nawet plemniki zaklasyfikowane jako klasa I MSOME nie są wolne od uszkodzeń DNA. Techniki oceny morfologii organelli ruchliwych plemników w czasie rzeczywistym nie są wystarczające do dokonania wyboru optymalnego plemnika, jednak mogą znacząco zredukować ryzyko wyboru plemnika uszkodzonego.

Przeprowadzone badania są indywidualnym wkładem w rozwój naukowej i praktycznej wiedzy dotyczącej niepłodności męskiej związanej z występowaniem fragmentacji DNA plemników. Wnioski wynikające z realizacji podjętych badań zweryfikowały hipotezy stawiane w literaturze naukowej oraz zwróciły uwagę na problemy metodyczne uniemożliwiające rzetelną i jednoznaczną interpretację dotychczas prezentowanych wyników.

2. Streszczenie w języku angielskim

According to WHO data infertility affects about 15-20% of couples worldwide, and in up to approx. 45% of cases, infertility results from the male factor. The most common cause of male infertility is low quality of sperm directly associated with a reduced sperm count, significantly reduced motility or changes in morphology. However, in about 10-20% of cases, the etiology of infertility remains unexplained.

Sperm quality is affected by a variety of factors and unfortunately it is not possible to indicate which one is primary. These disorders are caused by past diseases (viral or bacterial genitourinary tract infections, cancer), injuries, medications taken, stimulants used, hormonal activity and genetic disorders.

Sperm analysis, along with andrological evaluation and review of medical history, is the basic tool for assessing male infertility. The general sperm analysis is based on the analysis of the sperm sample to measure macro- and microscopic parameters such as: volume, pH, agglutination time, sperm concentration, motility, vitality, presence of leukocytes and morphology. The poor predictive value of currently used basic sperm tests may be due to the lack of adequate assessment of sperm DNA integrity.

The genetic material present in sperm is protected against damage in many ways, but the effectiveness of this protection is often impaired. It is estimated that almost 20% of patients with idiopathic infertility have an increased level of sperm DNA fragmentation. The lack of corrective mechanisms in mature sperm means that testing sperm DNA fragmentation may be a determinant of the quality of its genetic material and a prognostic indicator of the effectiveness of fertilization, development of pregnancy and chances for a live birth.

There are two main types of methods for assessing DNA fragmentation. The first includes methods for detecting DNA breaks that occur naturally or randomly in the DNA molecule (TUNEL and Comet assay (neutral variant)). The second type of methods includes tests that measure susceptibility of chromatin for denaturation under specific conditions (SCSA and Comet assay (alkaline variant)).

The series of publications concerns the influence of various factors such as the translocation carrier status or sperm morphology on the results of sperm analysis with particular emphasis on the degree of DNA fragmentation and difficulties in interpreting the results of research concerning assisted reproduction methods.

The increased probability of detecting aberrations in a patient with reduced sperm count has been described by many authors. However, research usually does not focus on comparisons

with other parameters, and if they are being compared then it is with the parameters of sperm donors. In my study, I decided to use a different approach and compare translocation carriers to randomly selected men with normal karyotype. Carriers of reciprocal translocations and the control group did not differ significantly in terms of sperm concentration, motility and vitality. However, these parameters were the lowest in the group of Robertsonian translocation carriers. I did not find significant differences in the level of DNA fragmentation among the groups.

After a thorough review of the literature on the methods of assisted reproduction and on the basis of my own research, I cannot reach unequivocal conclusions. Some of the doubts related to the discrepancy in research results may be due to the lack of understanding of the basic optics principles. Authors of scientific publications should be obliged to provide the parameters necessary to calculate the real magnification of the microscope and the obtained resolution used during the sperm selection procedure before the fertilization procedure. This will eliminate at least some of the doubts related to the discrepancy in the test results.

Clinical significance of sperm morphology is still debatable, and some studies show that accurate measurement of morphological parameters plays a very important role in assessing male fertility. The purpose of my next study was to investigate the relationship between the presence of vacuoles in sperm and DNA damage. The results of this study show that correct morphology and lower number of vacuoles was associated with the lower degree of DNA fragmentation. However, even sperm cells in MSOME class I were not free from DNA damage. Techniques for assessing sperm morphology of spermatozoa organelles in real time are not sufficient for optimal selection of sperm, however, they can significantly reduce the risk of selecting a damaged sperm.

This research is an individual contribution to the development of scientific and practical knowledge about male infertility associated with sperm DNA fragmentation. The conclusions from the results of my studies verified the hypotheses from the scientific literature and drew attention to methodical problems that prevent reliable and unambiguous interpretation of the results presented so far.

Słowa kluczowe:

fragmentacja DNA plemników, niepłodność męska, czynniki prognostyczne, Intracytoplasmic Sperm Injection, ICSI, metoda TUNEL, metoda Comet assay

Keywords:

sperm DNA fragmentation, male infertility, prognostic factors, Intracytoplasmic Sperm Injection, ICSI, TUNEL method, Comet assay method