

***In Vitro* akroszóma reakció és lehetőségek a határérték alatti akroszóma reakció növelésére**

Dr. Hajnal Ágnes, Dr. Mikus Endre

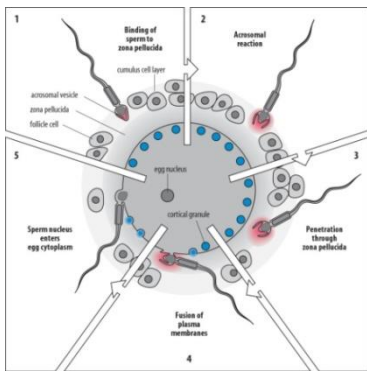
2017.11.17

Férfi oldali kivizsgálások

Infertilitási probléma

HABAB vizsgálatokkal párhuzamosan:

- Anatómiai elváltozások, sérülés
 - Spermatoqram
 - **DNS fragmentáció**
 - Genetikai vizsgálat (FISH technika)
- Koromoszóma törések és aberrációk kimutatása



Aszisztált reprodukció lehetősége felmerül:

- HBA
- Akroszóma reakció
- **DNS fragmentáció**,
(ha még nem történt meg)

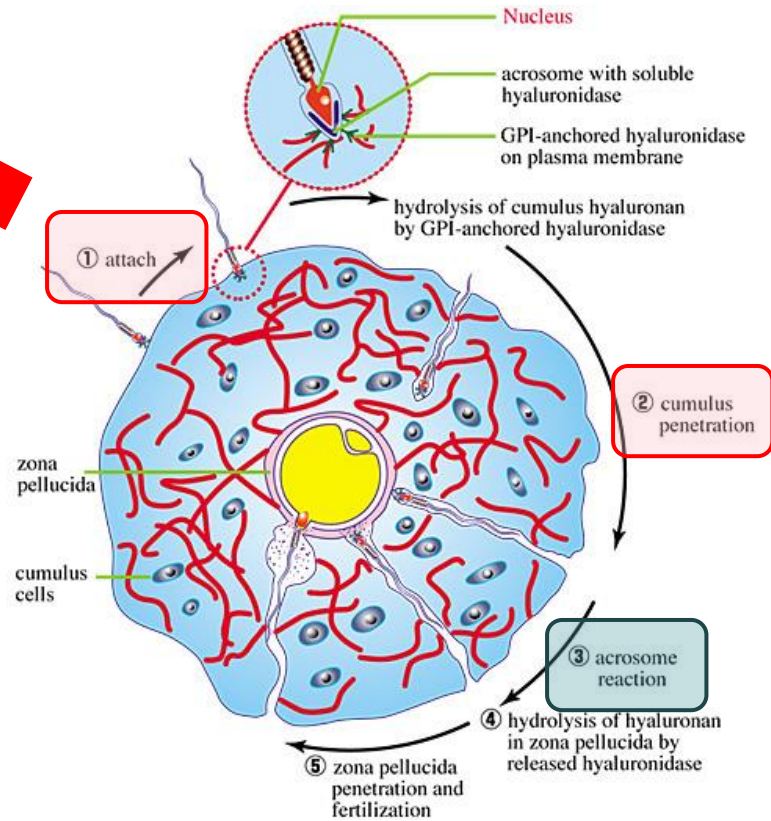
**Funkcionális
vizsgálatok**

**Eldönthető:
Terápia
vagy
inszeminálás, IVF, ICSI
+ *in vitro* beavatkozások**

HBA teszt vagy akroszóma reakció?

HBA teszt

De...



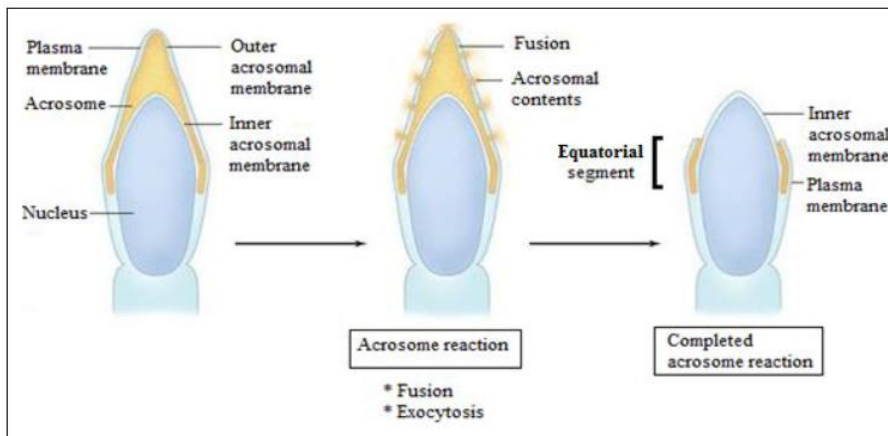
Akroszóma reakció

<http://www.glycoforum.gr.jp/science/hyaluronan/HA03/HA03E.html>

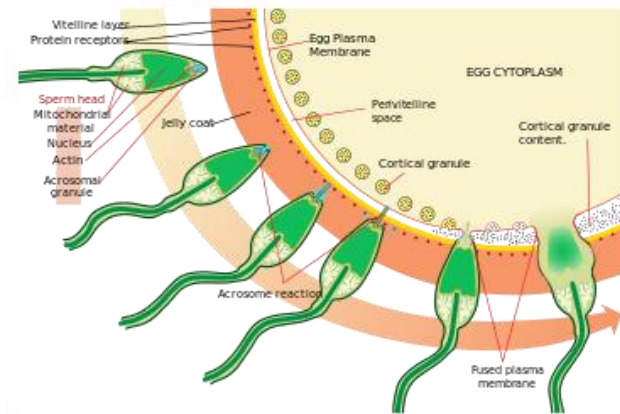
HBA teszt **és** akroszóma reakció!

Akroszóma reakció

- A spermiumok a kumulusz sejt rétegen áthaladva aktiválódnak, és a petesejt közelébe érve végbemegy bennük az AR.
- Ha nincs megfelelő számú AR, akkor nincs megtermékenyülés.



<https://humanphysiology2011.wikispaces.com/15.+Reproductive+Physiology>



https://en.wikipedia.org/wiki/Human_fertilization

Aktiváció

Akroszóma
Reakció

termékenyítés

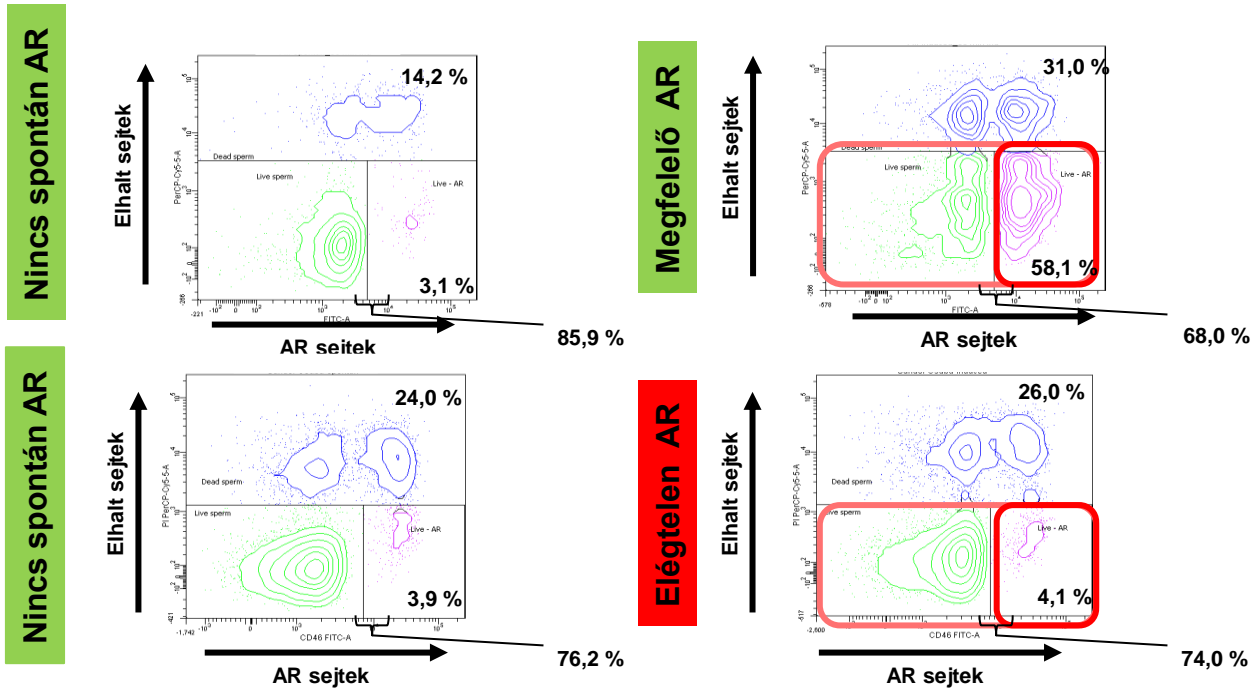
Akroszóma reakció mérés folyamata

WHO V. guideline-t követve



Spontán akroszóma reakció

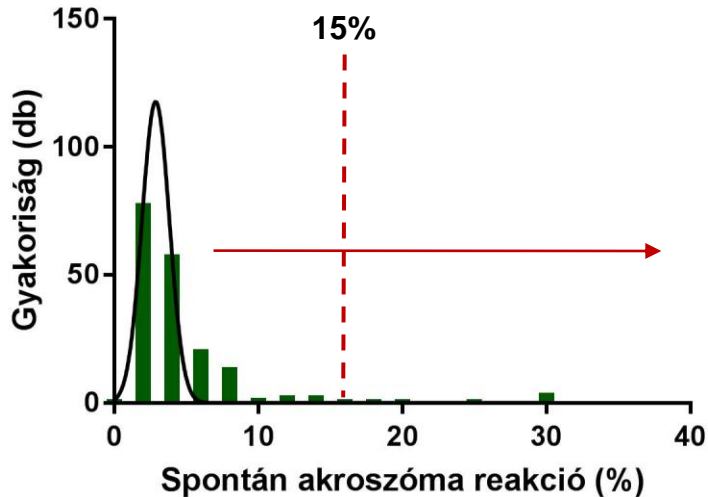
Indukált akroszóma reakció



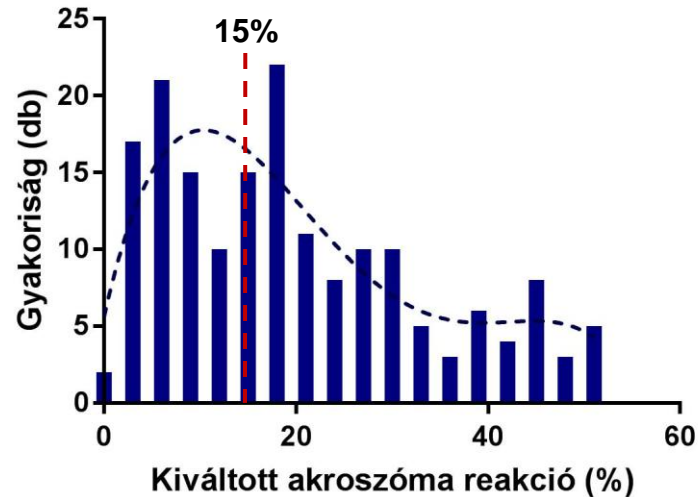
Eredmények I.

> 180 minta vizsgálata

Sontán AR megoszlás



Kiváltott AR megoszlás (ARIC)



WHO guideline kritériumok

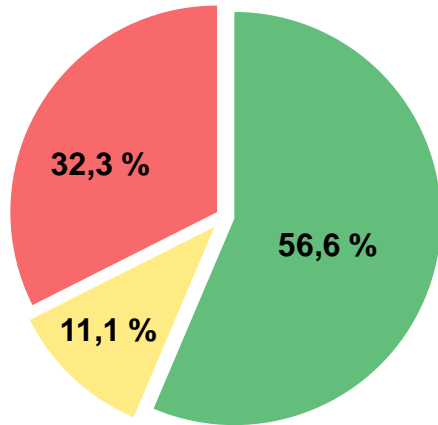
AR% a kezeletlen mintában:	≥ 15%	Prematurális (spontán) akroszóma reakció: Az akroszóma reakció a megfelelő stimulus hiányában is, idő előtt végbemegy.
	< 15%	Nincs prematurális (spontán) akroszóma reakció
ARIC pontszám:	< 10%	Elégtelen akroszóma reakció
	10-15%	Feltehetően elégtelen akroszóma reakció
	≥ 15%	Megfelelő akroszóma reakció

	Spontán	Kiváltott
5%	0,83%	3,1%
25% (Kvartilis 1)	1,3%	10,4%
50% Medián (Kvartilis 2)	2,4%	18,4%
75% (Kvartilis 3)	4,3%	31,0%
95%	8,8%	51,8%

Eredmények II.

AR és morfológia összefüggése

Indukált AR esetén (N>180)



■ Megfelelő AR

■ Feltehetően elégtelen AR

■ Elégtelen AR

	Megfelelő AR	Nem megfelelő AR
Normozoospermia	85 %	15 %
Nem normozoospermia	37 %	63 %

Értékelési kategóriák:

AR% a kezeletlen mintában:	≥ 15%	Prematurális (spontán) akroszóma reakció: Az akroszóma reakció a megfelelő stimulus hiányában is, idő előtt végbemegy.
	< 15%	Nincs prematurális (spontán) akroszóma reakció
ARIC pontszám:	< 10%	Elégtelen akroszóma reakció
	10-15%	Feltehetően elégtelen akroszóma reakció
	≥ 15%	Megfelelő akroszóma reakció

Fenotípus OK
(sejtszám, morfológia)

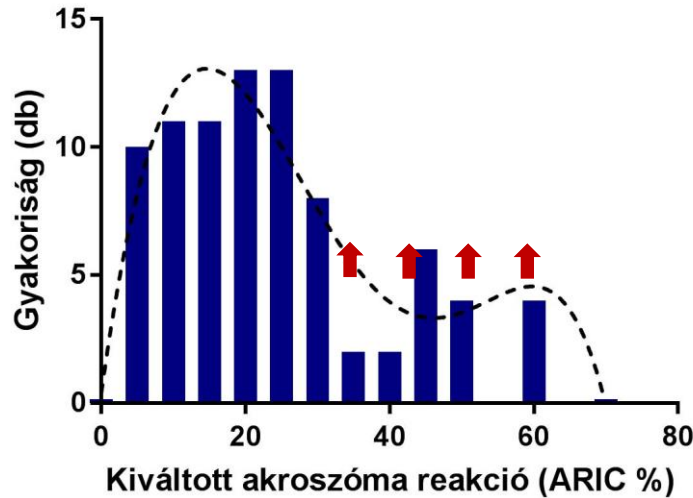


Funkcionálisan OK
(mozgás, aktiváció, sejt felszíni receptorok, sejten belüli szignalizációs út)

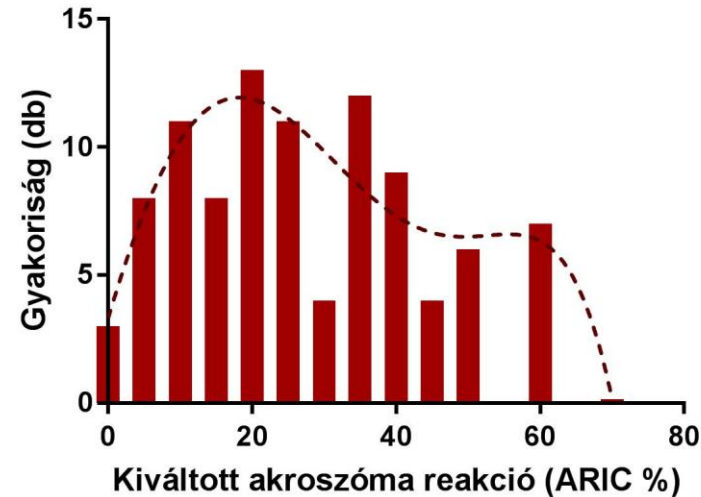
Hosszabb idejű kapacitáció hatása – I.

~200 mintából / ~ 100 vizsgálata

Gyakoriság megoszlás
3h

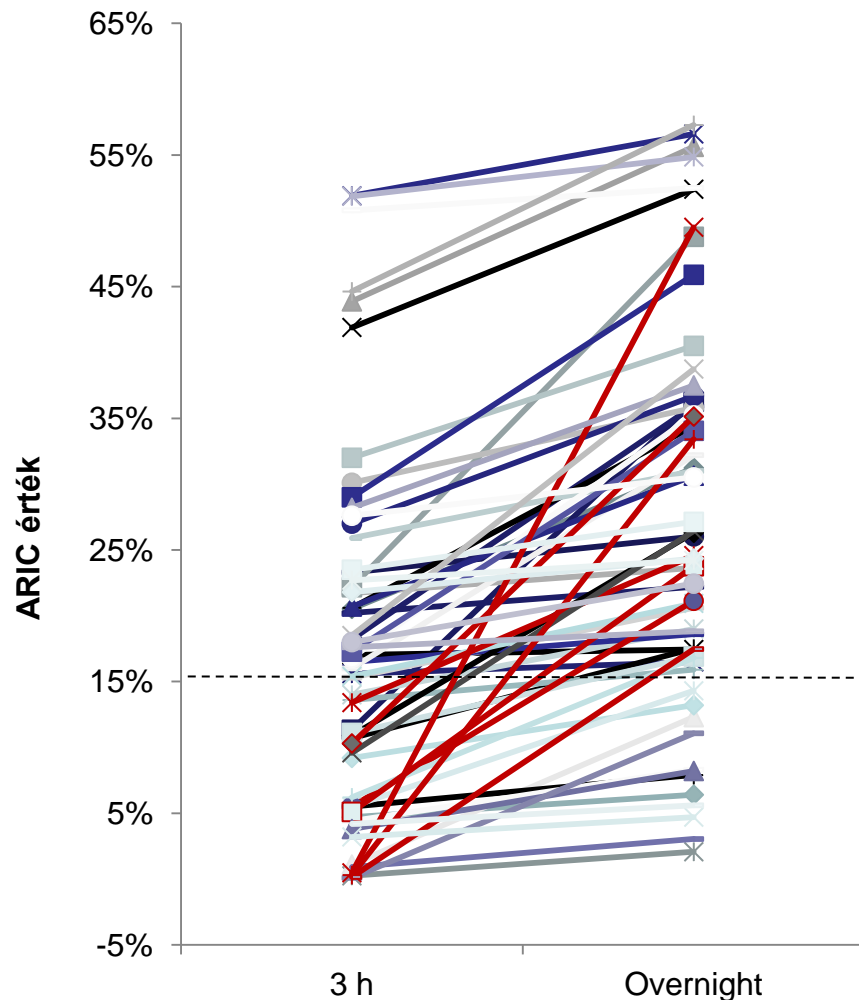


Gyakoriság megoszlás
Overnight



- Fokozottabb AR figyelhető meg a hosszabb kapacitáción átesett minták esetében
- A minták ~ 60 %-nál növelhető az AR.
- 96 vizsgált mintából jelentős javulás 21 minta esetében volt (22%).

Hosszabb idejű kapacitáció hatása – II.

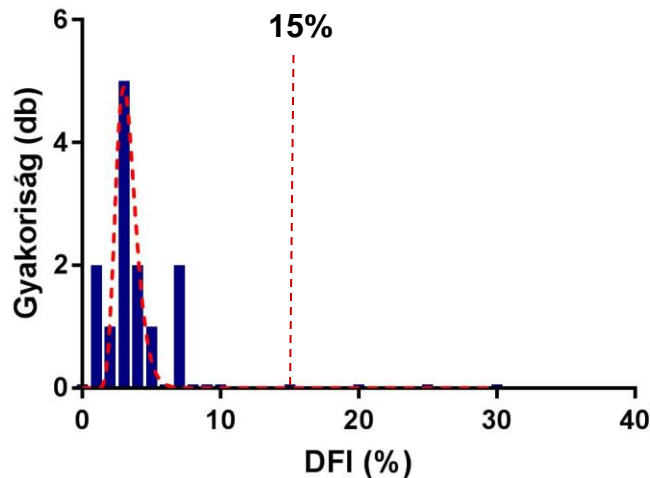


- Alacsony AR értékről határérték feletti értékre növekedés lehetséges a minták 19%-nál.
- Nincs összefüggés az előzetes jó AR eredmény és a hosszabb idejű kapacitáció kiváltotta AR növekedés között.

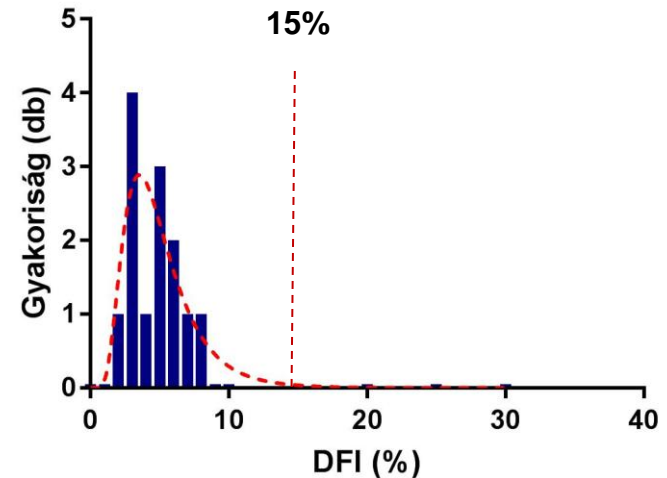
Egyéni variancia!

Hatás a DNS fragmentációra

DNS fragmentációs index
3h



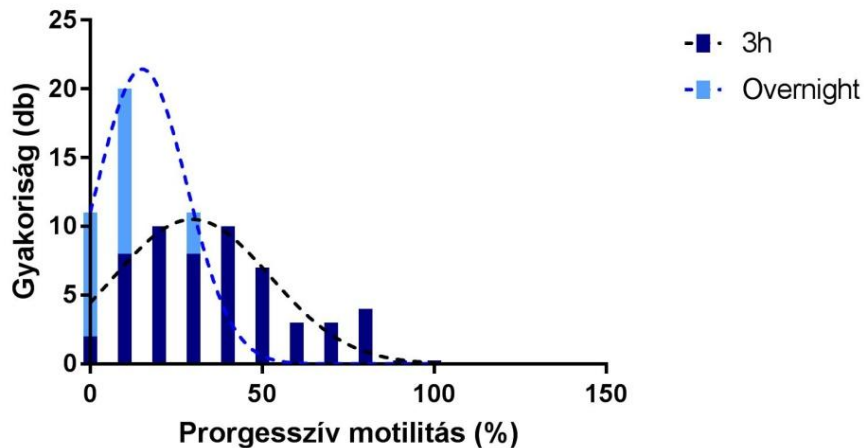
DNS fragmentációs index
Overnight



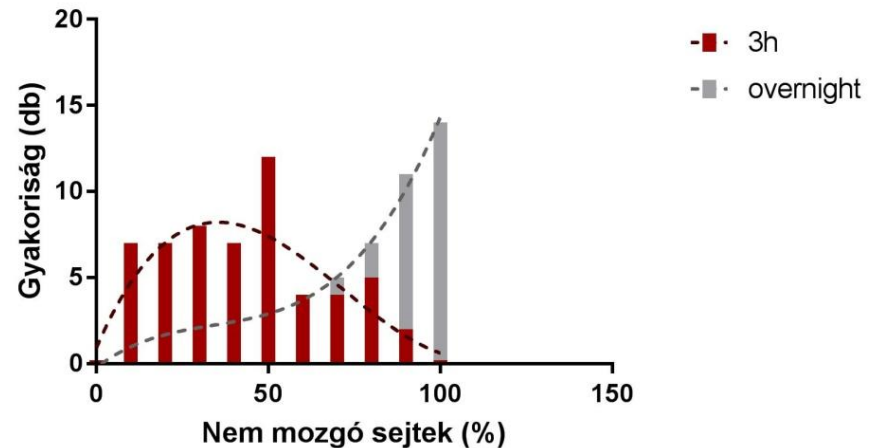
- Szeperáció nagymértékben csökkenti a fragmentált DNS tartalmú sejtek számát.
- Nincs változás a DNS fragmentációban a kapacitációs idő hosszabbításával.

Hatás a mozgékonyásra

Progresszíven mozgó spermiumok



Nem mozgó sejtek megoszlása



N=56 minta

- Progresszív motilitás minden esetben csökkent, vagy nem változott
- Nem progresszív mozgás 14 minta esetében nőtt (25 %)
- Nem mozgó spermiumok száma nőtt.

Lehetőségek határérték alatti AR növelésére in vitro

Kapacitációt elősegítő körülmények

- Oldatok
- Időtartam

Hormonális

- Progeszteron
- Esztrogén

AR növelés

Direkt AR kiváltás

- Ca²⁺ ionofór

Komplex hatás fokozás

- pentoxifylline

Spermium funkciók növelése *in vitro*

Személyre szabott eljárások

1. Minta



Vizsgálatok
- fenotípusos
- funkcionális

*Vizsgálócentrum/
Reprodukciós
Központ*

LabMagister

2. Minta



Személyre szabott
- *in vitro* eljárások
tesztelése

LabMagister

3. Minta



Aszisztált Reprodukciós
folyamat előtt kiválasztott
in vitro módszer

*Vizsgálócentrum/
Reprodukciós Központ*

In vivo
Terápiásan javítható



Terápiásan nem javítható
In vitro javítható

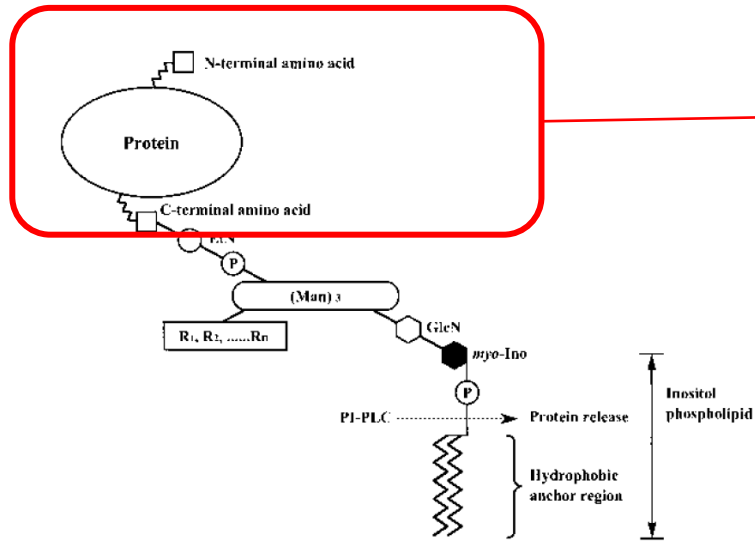
Összefoglalva

- >180 minta vizsgálata
- Spontán és kiváltott AR mérés áramlási citométerrel
- Az akroszóma reakciót a reprodukciós központok beépítették a vizsgálati protokolljukba.
- Az AR *in vitro* is növelhető.
- Egyéni variancia → személyre szabott kezelések ...



BACK-UP SLIDES

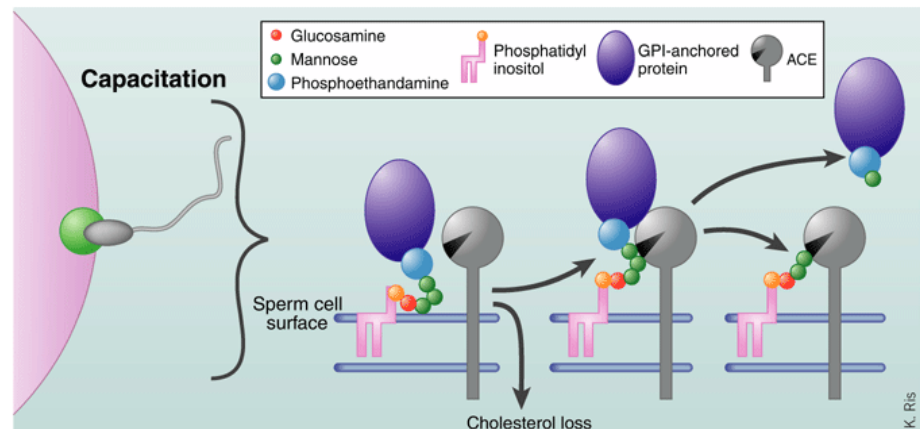
GPI-anchored protein



Leváló fehérjerész pl: PH20

- aktiválódott spermiumon
- hyaluronáz aktivitással rendelkezik
- kumulusz sejtek rétegén való átjutás

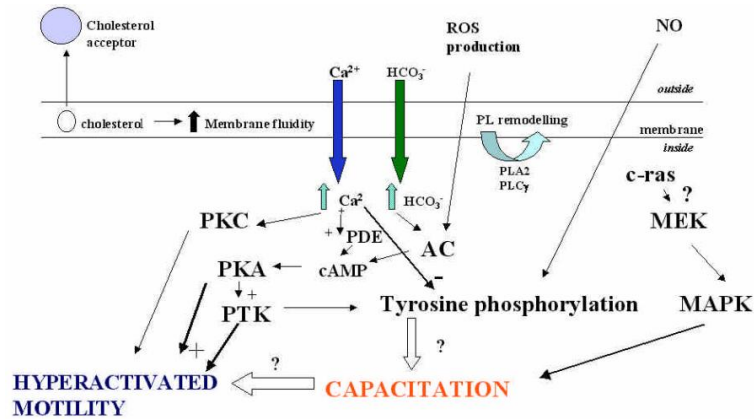
Hirih Ikezawa: Glycosylphosphatidylinositol (GPI)-Anchored proteins;
Biol. Pharm. Bull. 2002, 25(4): 409-417.



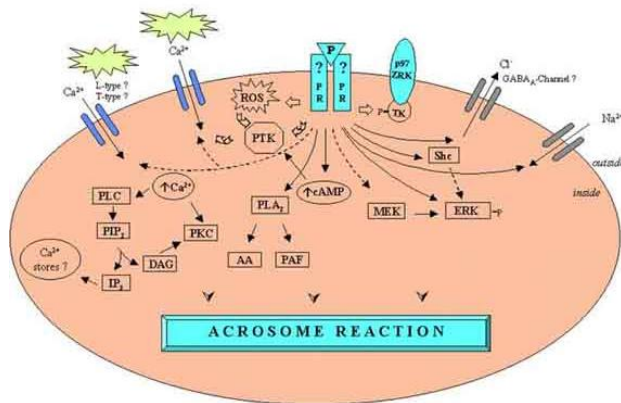
Satyajit Mayor. ACEing GPI release. Nature Structural & Molecular Biology; 2005, 12: 107-107

Mi az oka?

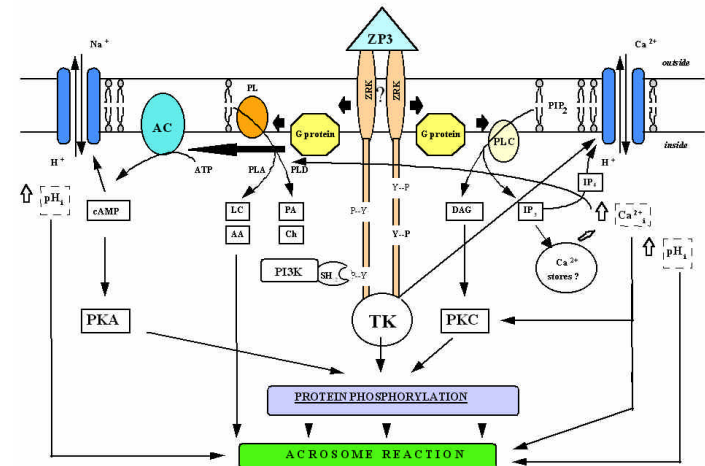
Kapacitáció folyamata



Progeszteron indukálta AR



ZP keresztül megvalósuló AR

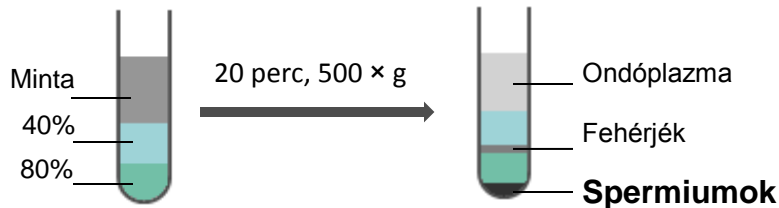


Akroszóma reakció mérés folyamata

WHO V. guideline-t követve

Szeperáció

1. Spermiumok szeperálása
sűrűséggradiens centrifugálással



Kapacitáció

2. Inkubálás kapacitációt elősegítő
körülmények között:

Spermium szuszpenzió (10^6 db/ml)



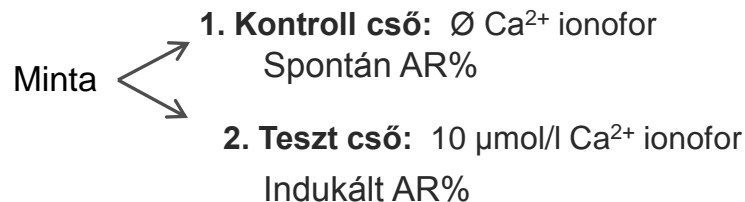
3 hours



37°C, 5% CO₂

Akroszóma reakció kiváltása

3. AR indukálása Ca²⁺ ionoforral



30 min



37°C, 5% CO₂

Akroszóma reakció detektálása

4. CD46 és propidium-jodid jelölés,
áramlási citometriás mérés

Propidium-jodid:

Életképtelen spermiumok kizárása

CD46-FITC:

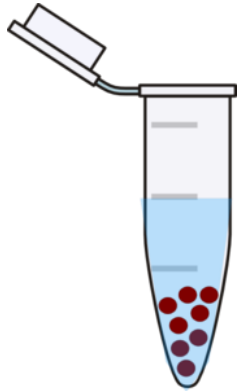
Intakt akroszóma: negatív

AR végbement: pozitív

Értékelés

(WHO laboratory manual for the Examination and processing of human semen V.)

1. Kontroll cső (spermiumok – Kontroll)



Prematurális (Spontán) AR mutató sejtek %-os aránya

≥ 15%

Prematurális (spontán) akroszóma reakció:
Az akroszóma reakció a megfelelő stimulus hiányában is, idő előtt végbemegy.

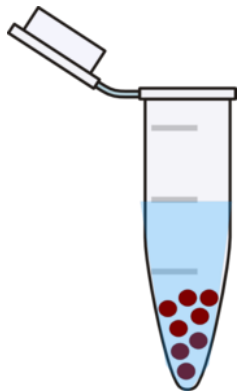
!!!

0 - 15%

Alacsony prematurális (spontán) akroszóma reakció

OK

2. Tesztcső (spermiumok + Ca²⁺ ionofore – Indukált) - 1. Tesztcső (Kontroll)



ARIC pontszám (Acrosome Reaction after Ionophore Challenge)

$ARIC = AR\%(indukált\ minta) - AR\%(kezeletlen\ minta)$

≥ 15%

Megfelelő akroszóma reakció

OK

10–15%

Feltehetően elégtelen akroszóma reakció

!

0 - 10%

Elégtelen akroszóma reakció

!!!

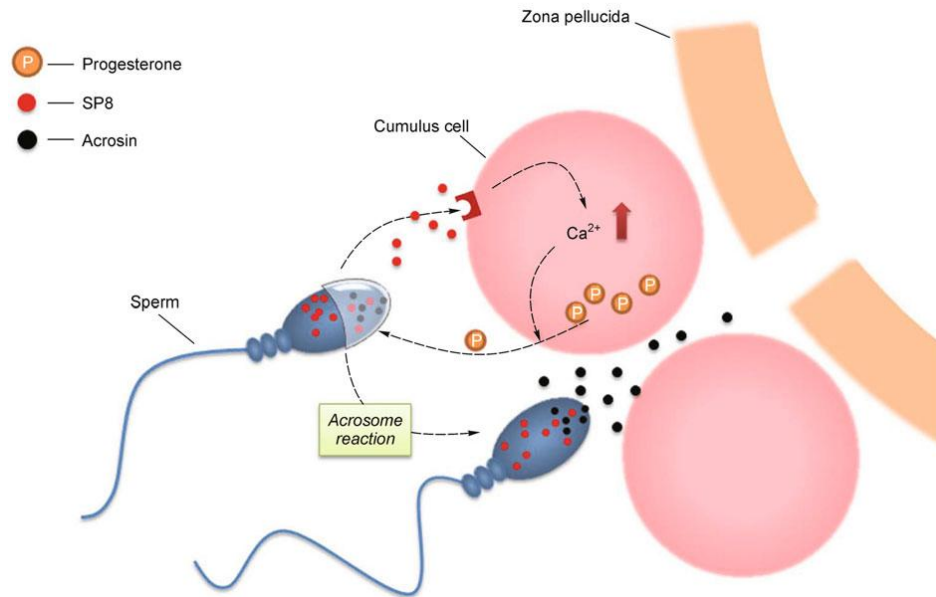
Hatás az akroszóma reakcióra



Jelentős javulás 21 minta esetében volt (22 %).

Nem prediktálható, hogy az adott minta javítható-e vagy sem.

Progesteron indukálta AR



Schematic representation of sperm releasing NYP-SP8 (SP8) and interacting with cumulus cells. As a result of SP8 binding to cumulus cell surface, intracellular calcium of the cumulus cell increases and leads to progesterone release, which subsequently triggers AR to facilitate sperm penetration of the cumulus.

Ting Ting Sun, Chin Man Chung, Hsiao Chang Chan

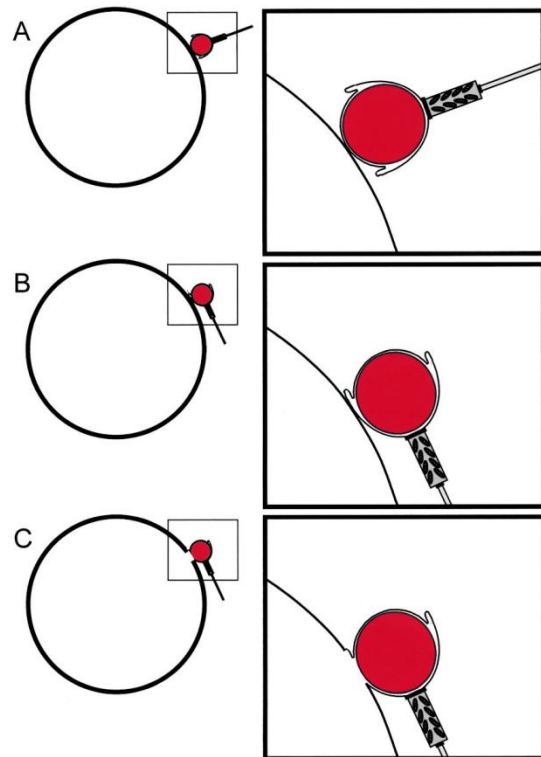
Acrosome reaction in the cumulus oophorus revisited: involvement of a novel sperm-released factor NYD-SP8

Protein Cell 2011, 2(2): 92–98

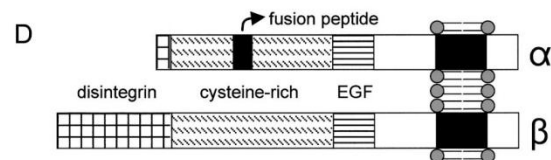
DOI 10.1007/s13238-011-1022-5

- Nagy számú spermiumban végbemegy az AR még mielőtt elérné a ZP réteget.
- ZP3-ZP3R nem az egyetlen út az AR kialakításához
- Biz. Spermiumokban az AR végbemegy, ha kapcsolatba kerül a kumulusz sejtekkel
- Biz. Spermiumokban csak a ZP-val való kapcsolat után alakul ki az AR.
- A kumuluszsejtek és a spermiumok közötti párbeszéd.
- A kumulusz sejtek rétege sokkal szorosabb barrier, mint gondoltuk.

Ivarsejtek membrán- összeolvadásának végső fázisa

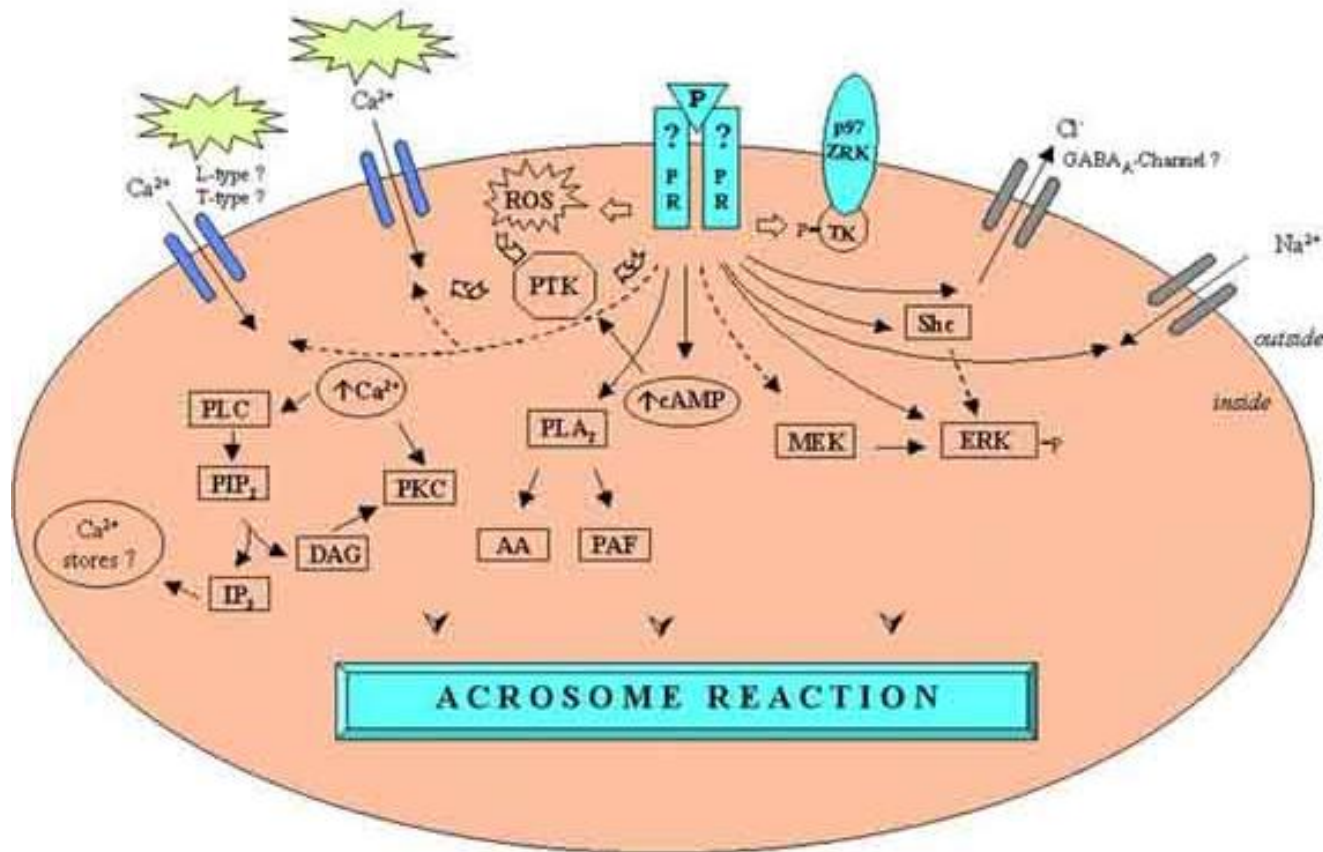


Sperm egg binding and subsequent fusion is a three-step event. (A) Sperm initially binds with the apical tip of the inner acrosomal membrane to the oolemma. (B) After proper positioning, the apical binding is diminished and has facilitated a lateral binding of the sperm cell to the oolemma. The equatorial region of the sperm head plasma membrane is involved in this process. (C) The sperm cell is now capable of fusing its equatorial plasma membrane with the oolemma. The tail stops beating and stiffens after equatorial sperm binding. (D) The multidomain organization of fertilin (heterodimer protein from the ADAM family) has been proposed to be directly involved in processes (B) and (C). (A-C adapted from [3] and D from [383])



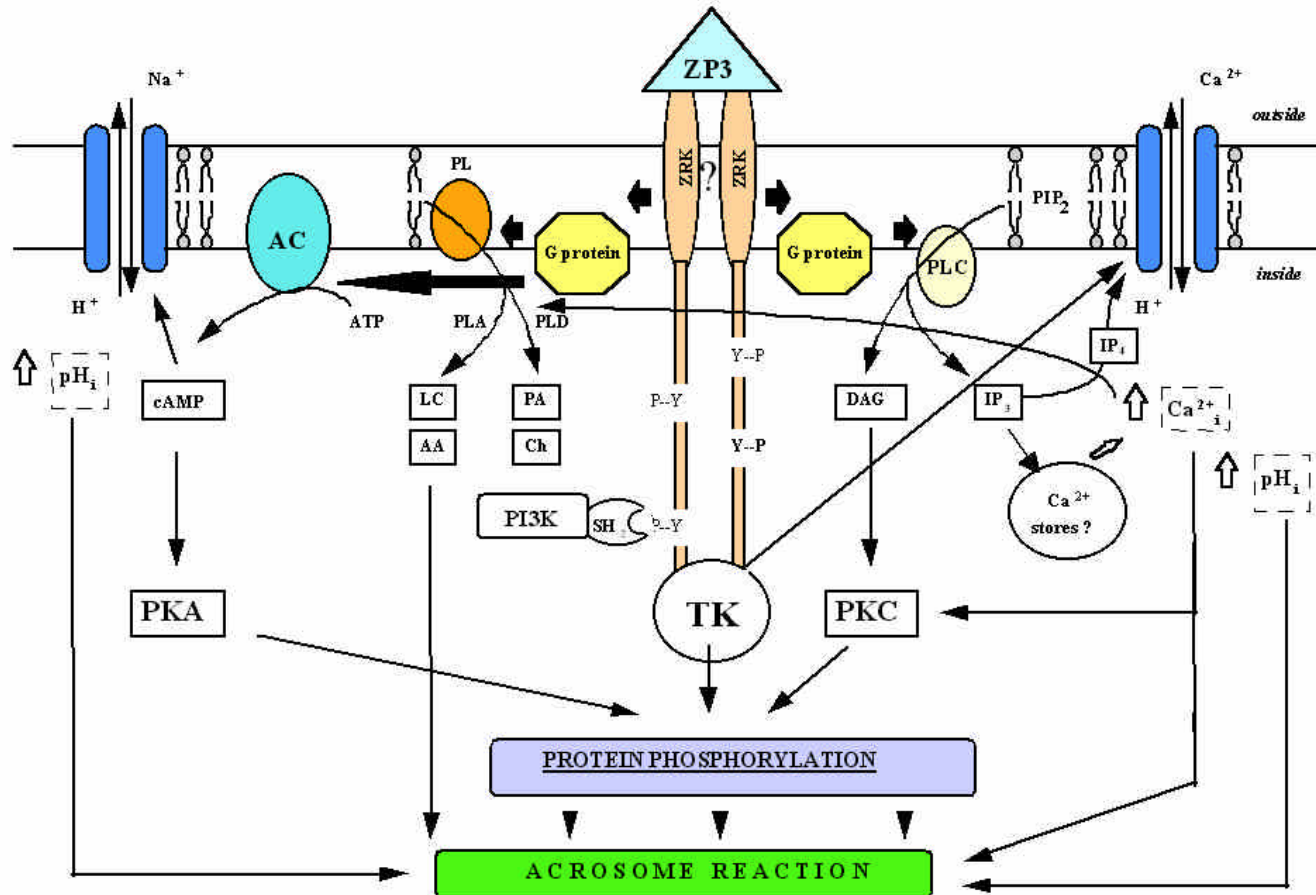
Fletsch, F, M. Dynamics of the mammalian sperm plasma membrane in the process of fertilization. *Biochimica et Biophysica Acta*; 2000, 1469: 197-235.

Progeszteron indukálta AR szignalizációs út



[Elisabetta Baldi](#), Michaela Luconi, Lorella Bonaccorsi, Gianni Forti
NONGENOMIC EFFECTS OF PROGESTERONE ON SPERMATOZOA:
MECHANISMS OF SIGNAL TRANSDUCTION AND CLINICAL IMPLICATIONS
Frontiers in Bioscience. 1998; 3: d1051-1059

Akroszóma reakció ZP át megvalósuló molekuláris mechanizmusa





Gyenge HBA reakció kezelése

INCREASED HYALURONAN ACID BINDING ABILITY OF SPERMATOZOA INDICATING A BETTER MATURITY, MORPHOLOGY, AND HIGHER DNA INTEGRITY AFTER MICRONUTRIENT SUPPLEMENTATION

Sub-/infertile males were invited to participate and take two daily capsules of the active compound for a 3-month period between the first and the follow-up semen analysis. Each capsule contained L-carnitine, L-arginine, zinc, vitamin E, glutathione, selenium, coenzyme Q10 (CoQ10), and folic acid (Profertil®). 40 sub-/infertile men receiving no active treatment served as controls; this was measured by change in SHBA after 3 months

In vitro beavatkozási lehetőségek

• növeli a mozgó spermiumok mozgását (curvilinear velocity, path velocity, stait-line velocity, lateral head displacement, beat cross frequency) mind normozoospermiás és asthenozoospermiás páciensekben

• Nem növeli a mozgó spermiumok számát

• 10 min – 2 h-ig megmarad az aktív mozgás

• növeli a kevésbé fragmentált spermiumok arányát a mintában

Mozgás és aktivitás csökkenése/hiánya

Pentoxiphillin

DNS állomány fragmentáltsága

Fagyasztás-
Felolvasztás

In vitro
lehetőségek

Rossz AR

Ca²⁺ ionophore,
Progeszteron,
Follikulus folyadék,
egyéb

Kombinált probléma

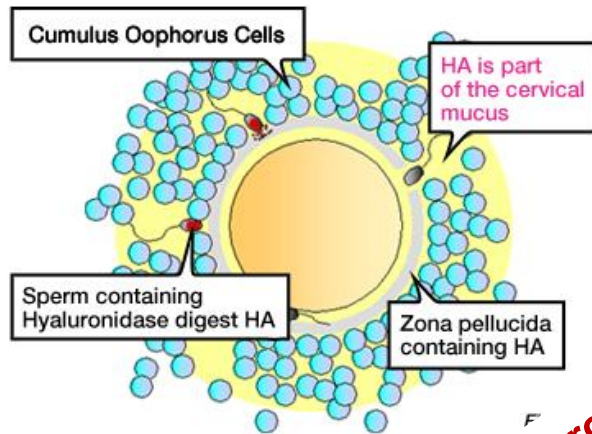
Pentoxiphillin + FF

• Indukált AR az ICSI előtt növeli az AR spermiumok arányát, növeli a sikeres terhességek számát

Egyéni variancia!

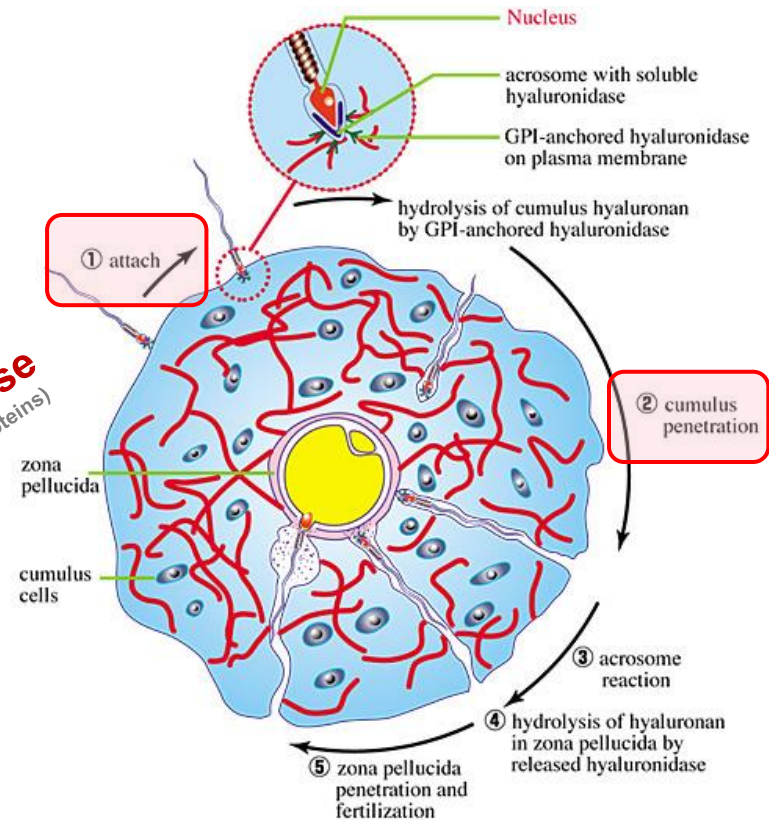
Hialuron kötődési képesség vizsgálata

HBA teszt



<http://www.zesticafertility.ca/science.php>

CD44 – Hyaluron kötő receptor
+
GPI-anchored hyaluronidase
(Glycosylphosphatidylinositol (GPI)-Anchored proteins)

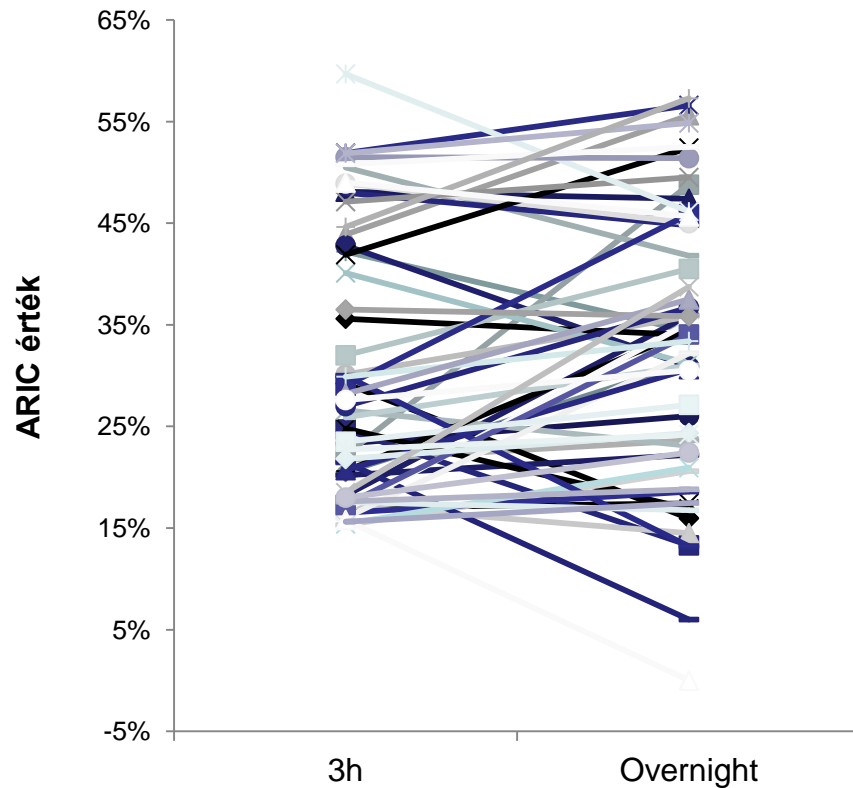


<http://www.glycoforum.gr.jp/science/hyaluronan/HA03/HA03E.html>

Hyaluron Binding Assay (HBA) teszt

Az akroszóma reakcióval együtt (max 1 hónap különbséggel) érdemes elvégezteni ezt a vizsgálatot is.

Megfelelő AR 3h inkubáció után



Vizsgált minták (96 db)

Megfelelő AR esetén (58 db):

37 növekedés ↑

21 csökkenés ↓

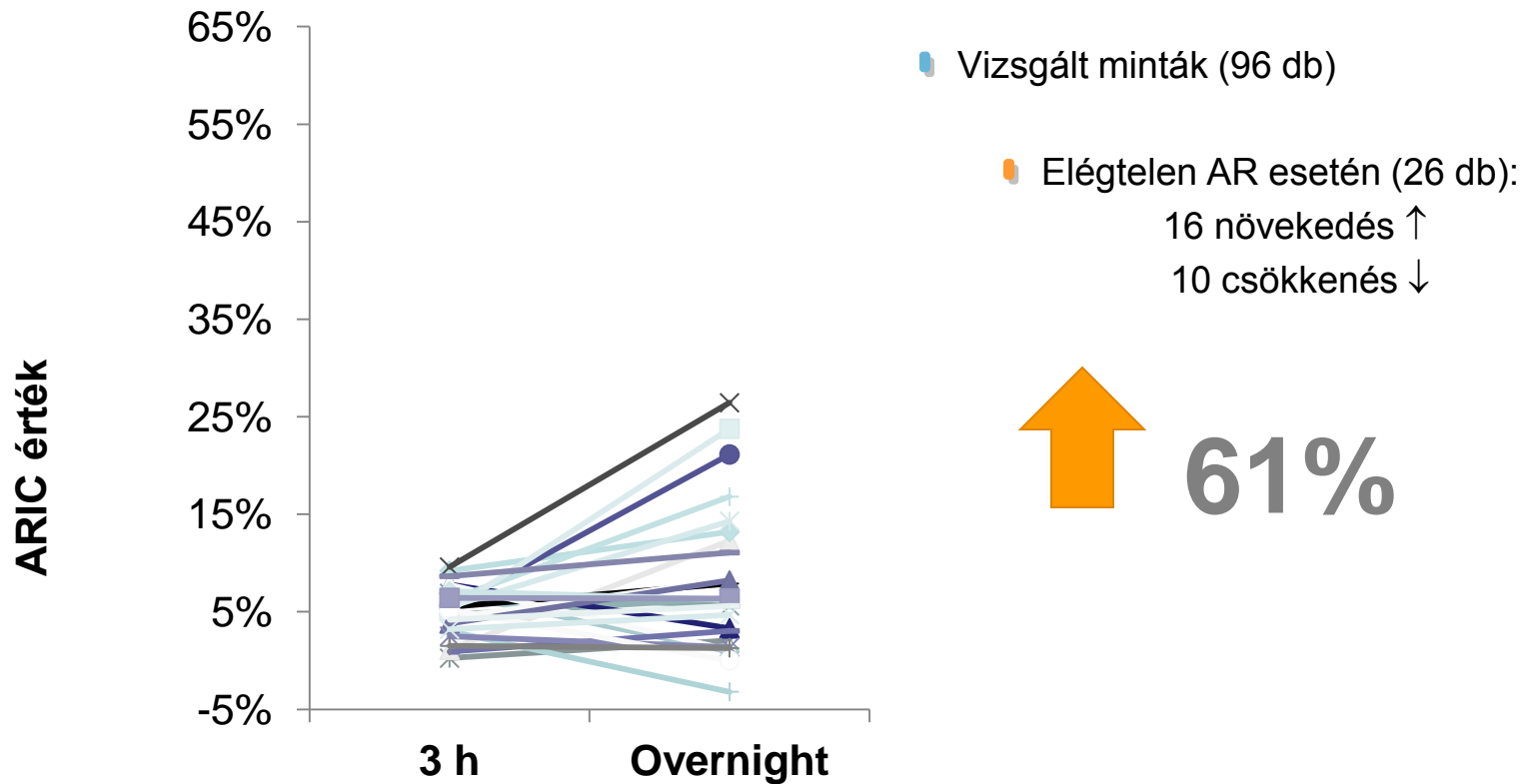


63%

Jelentős javulás 12 minta esetében volt.

32 %

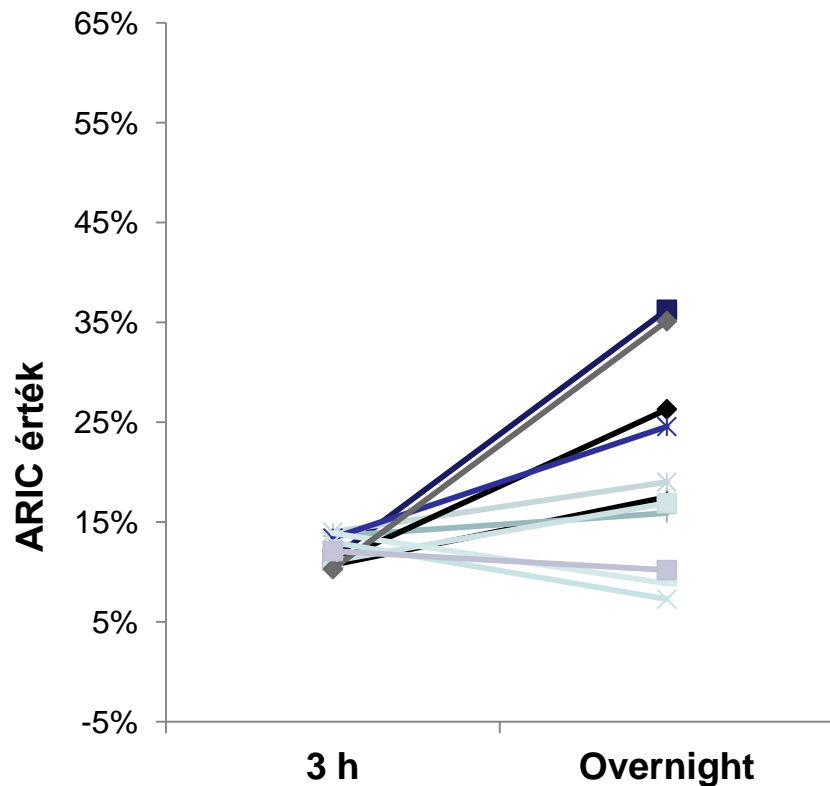
Elégtelen AR 3h inkubáció után



Jelentős javulás 5 minta esetében volt.

31 %

Feltehetően elégtelen AR



Vizsgált minták (96 db)

Feltehetően elégtelen AR esetén (11 db):

8 növekedés ↑

3 csökkenés ↓

↑ 73%

Jelentős javulás 4 minta esetében volt.

50 %