

# Fagyasztás, felolvasztás, preparálás hatása a humán DNS fragmentáltságára

**Nagy Melinda**

**MART VII. kongresszusa**

**Sümege, 2015.05.8-9**



**H U M A N C E L L**  
EGÉSZSÉGÜGYI SZOLGÁLTATÁSOK



# Bevezetés

- Intézetünk egyik feladata a férfi infertilitás alapos kivizsgálása, a lehető legpontosabb diagnózis felállítása és az esetleges probléma kezelése.
- A pontos diagnózis segít az orvosoknak, az ART centrumoknak a leghatékonyabb terápia és a megfelelő megtermékenyítési technika kiválasztásában .
- A spermium genetikai állományának épsége elengedhetetlen a megfelelő termékenyítéshez és a korai magzati fejlődéshez.
- Azok a spermiumok, amelyek nagy százalékban tartalmaznak fragmentált DNS-t , alkalmatlanok életképes utód létrehozására.
- Irodalmi adatok szerint a humán ondóminták fagyasztása és fagyasztva tárolása növeli a spermiumok DNS állományának fragmentáltságát, és ezzel párhuzamosan csökkenti azok termékenyítő képességét.

# Részletesebb spermium vizsgálat indokolt

- Ismeretlen eredetű meddőség
  - Jó spermakép / de elmarad a gyermekáldás
  - Több sikertelen lombik próbálkozás
  - Elégtelen embriófejlődés
  - Habitualis vetélés
- 
- Intézetünkben olyan páciensek DNS fragmentáltságát vizsgáltuk, ahol évek óta nem jött létre terhesség, vagy pedig vetéléssel végződött próbálkozások voltak. Közel másfél éve kezdtük el a férfi oldal alaposabb kivizsgálását.

# Vizsgálataink menete és alkalmazott eljárások

1. Friss ejakulátum analízise WHO 5. előírásának megfelelően.
2. A rutin labordiagnosztikai vizsgálatok után visszamaradt natív minták DNS fragmentáltságát vizsgáltuk áramlási citometriára épülő Sperm Chromatin Structure Assay (SCSA) módszerrel.
3. A fagyasztást SpermCryo All-round (Gynotec) előírt protokoll szerint végeztük és a mintákat a vizsgálatok elvégzéséig folyékony nitrogénben tároltuk. A fagyasztott mintákat a mérés napján 37°C-os vízfürdőben felolvasztottuk.
4. A felolvasztott minták preparálását szintén adott protokoll alapján végeztük el (SpermFilter, SpermWash Gynotec).  
/gradiens centrifugálás, majd mosás/
5. A DNS fragmentáltságot a fagyasztás előtt, a felolvasztás után és a felolvasztást követő mintapreparálás után határoztuk meg.

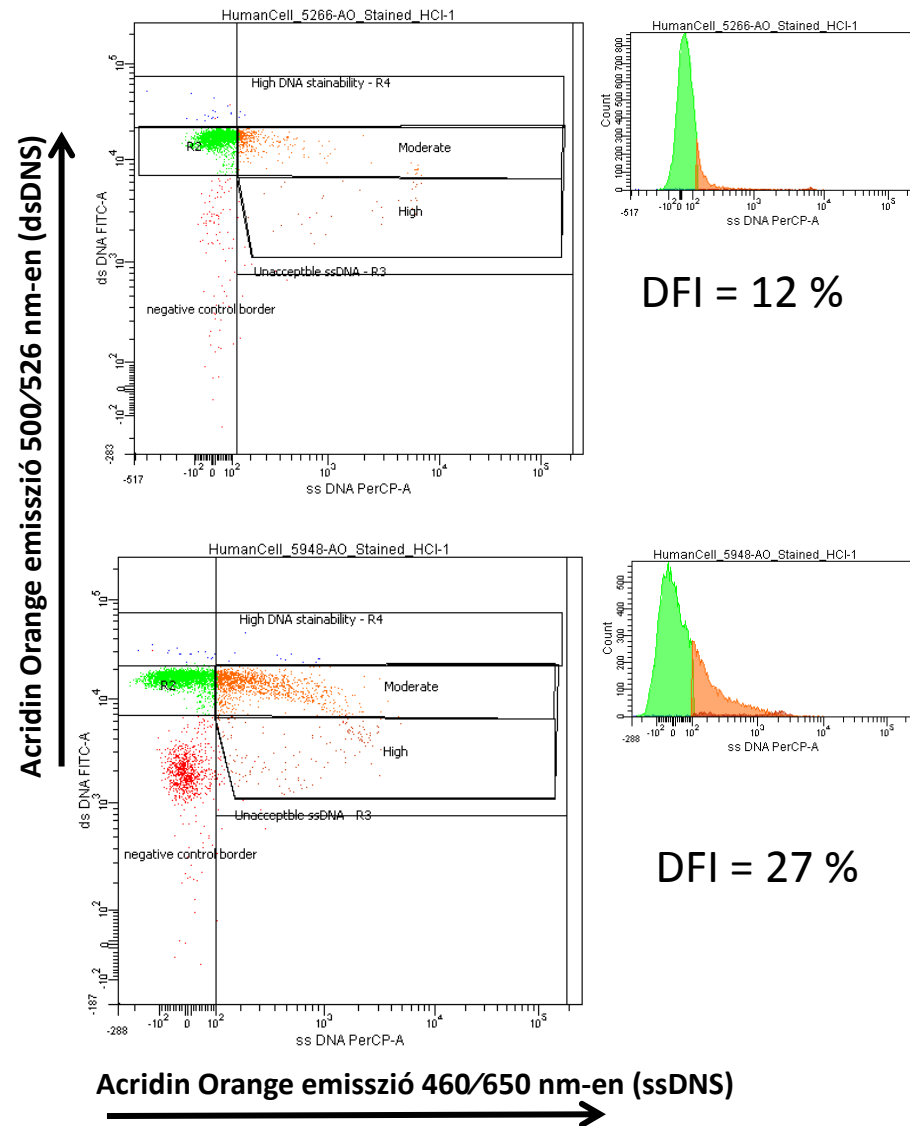
# DNS fragmentációs vizsgálat (SCSA módszer)

Enyhe savas kezelés denaturálja a DNS-t a törések mentén

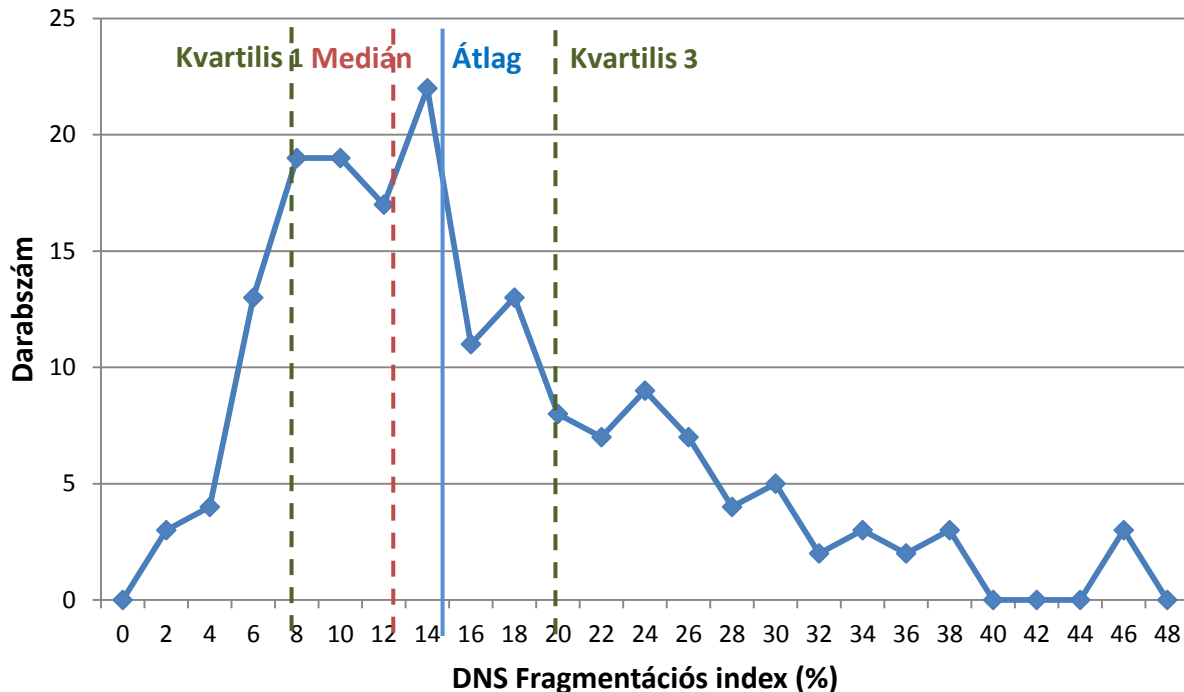
Acridin Orange festék képes kötődni a szimpla szálú illetve a dupla szálú DNS lánchoz, de az emissziós hullámhosszuk más

Eltérő emissziós maximum a kötődés függvényében

Mintánként 10.000 db spermium DNS fragmentáltságát mérjük meg

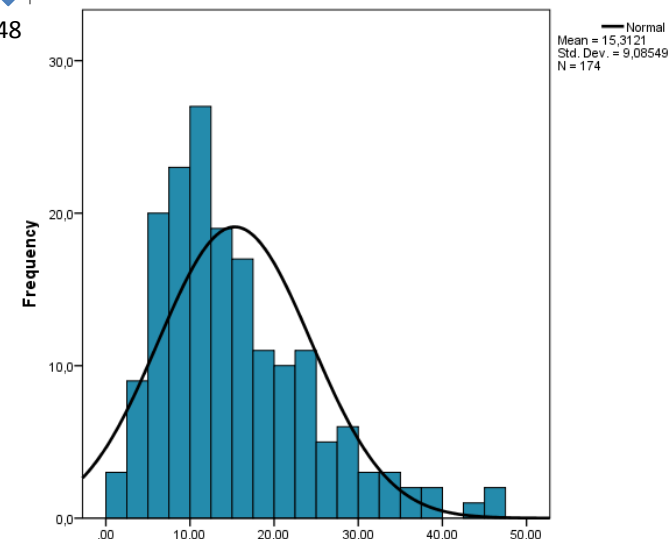


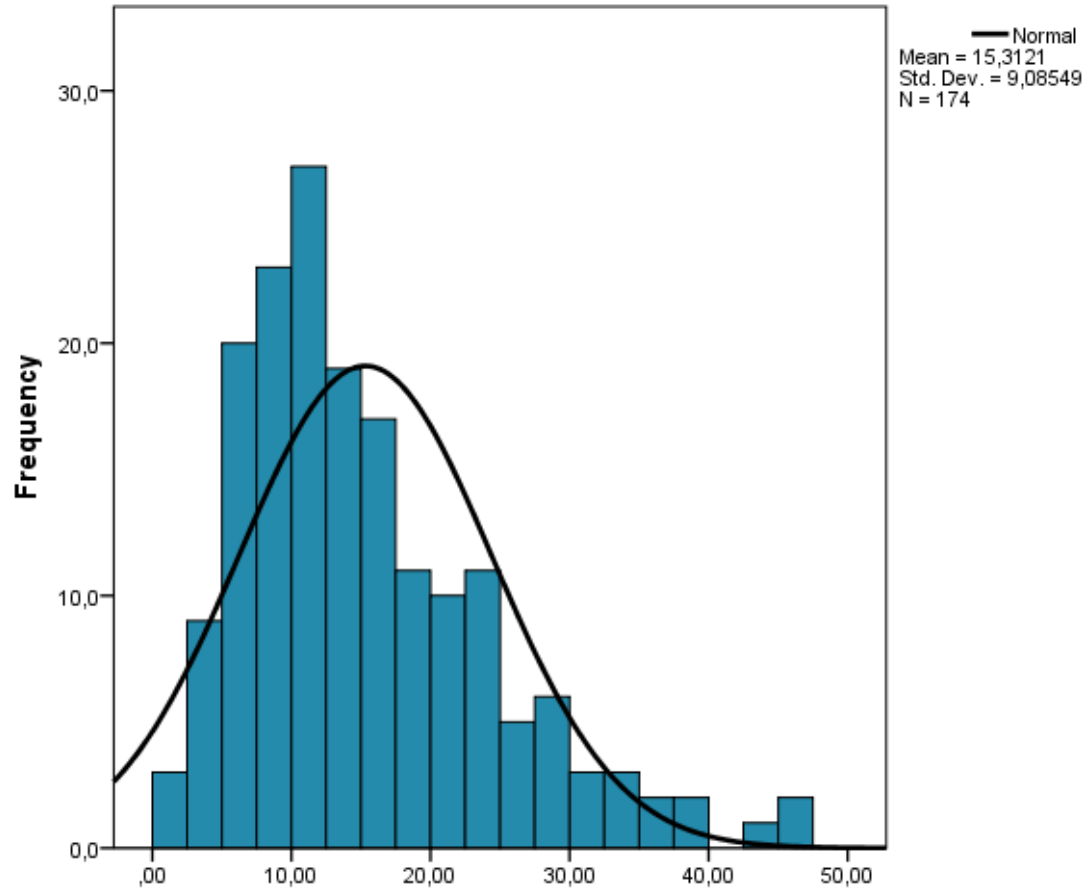
# Eddig diagnosztikai céllal mért összes ondó minta DNS fragmentációjának gyakoriság megoszlása



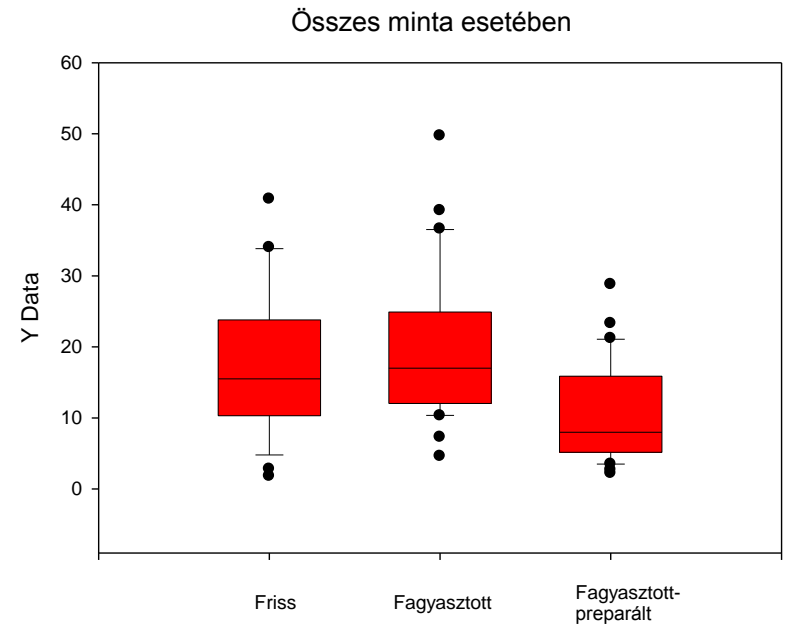
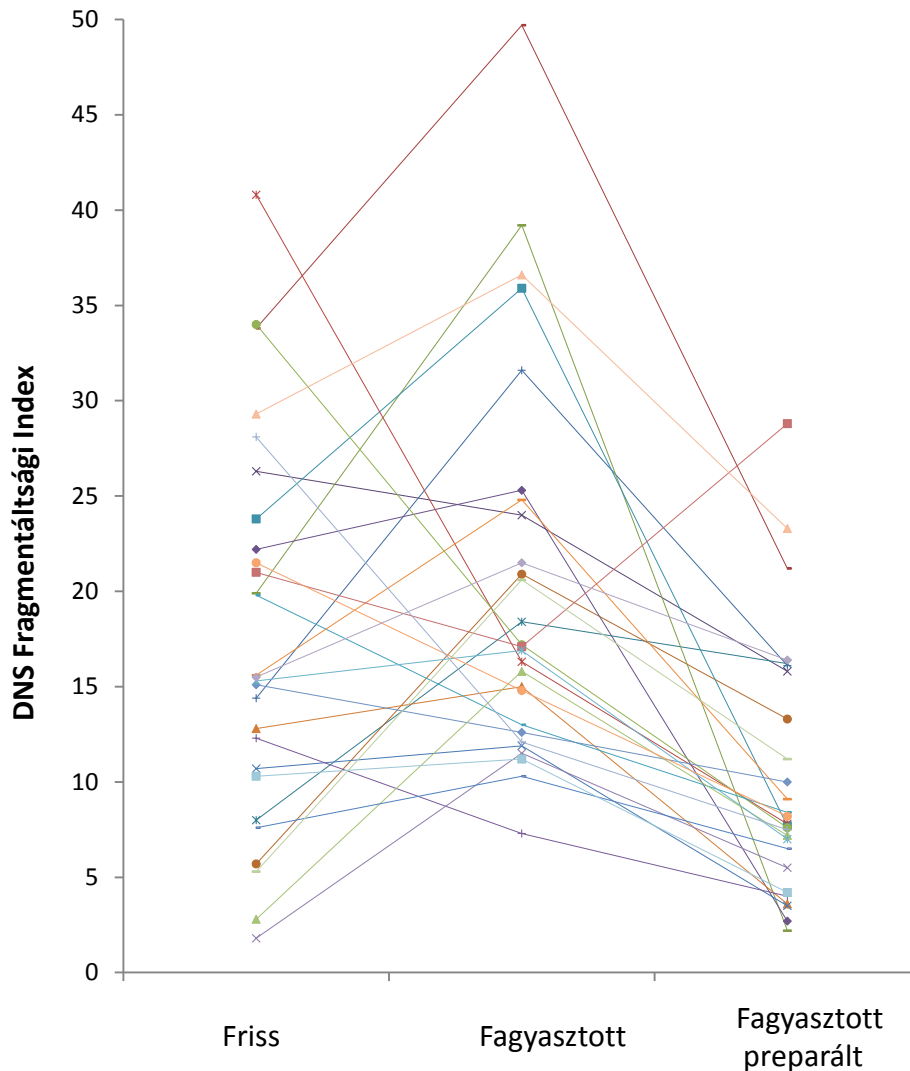
Átlag:	15,3
Medián (Kvartilis 2):	13,0
Kvartilis 1:	8,6
Kvartilis 3:	20,5

n=174 db   **Átlag: számtani közép**  
**Medián: mértani közép**





# Vizsgálat eredménye 1.



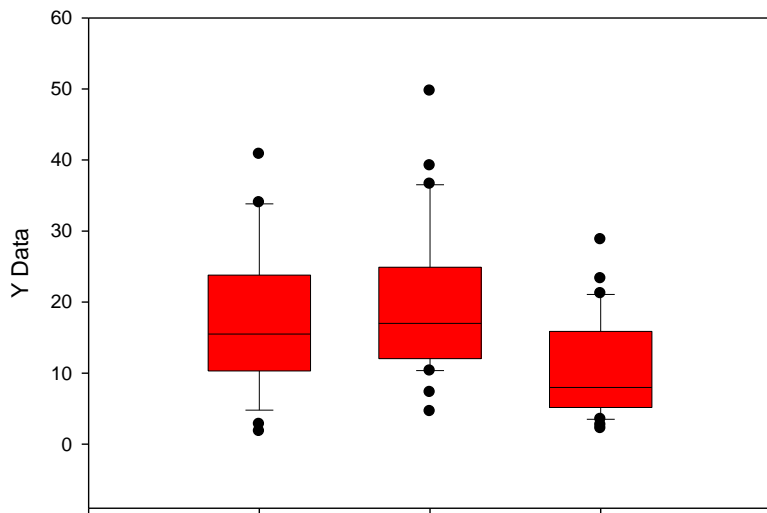
	Friss	Fagyasztott	Fagyasztott preparált
Átlag:	17,5	20,4	10,2
Medián:	15,5	17,1	7,8

n = 30



# Vizsgálat eredménye 2.

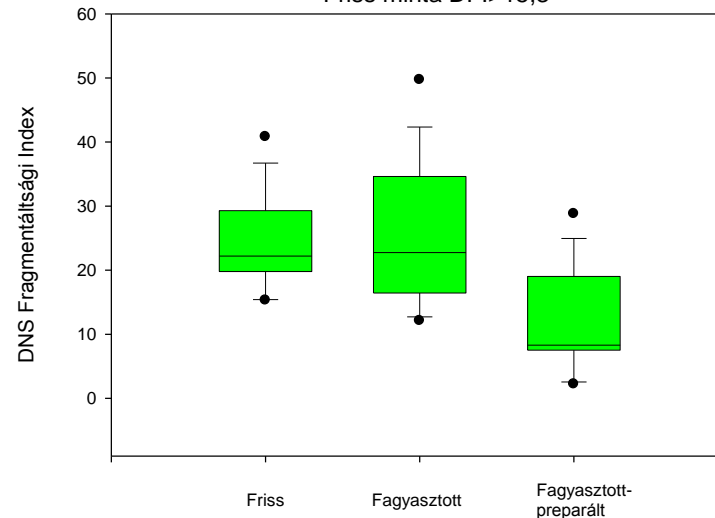
Összes minta esetében



	Friss	Fagyasztott	Fagyasztott-preparált
Átlag:	17,5	20,4	10,2
Medián:	15,5	17,1	7,8

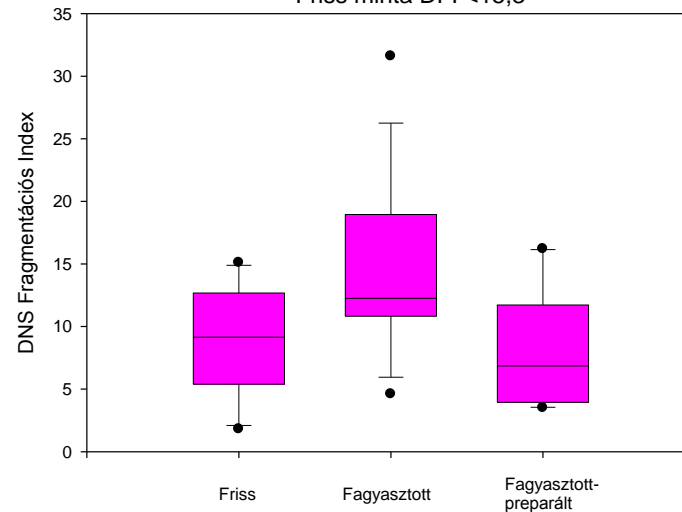
n= 30

Friss minta DFI>15,3

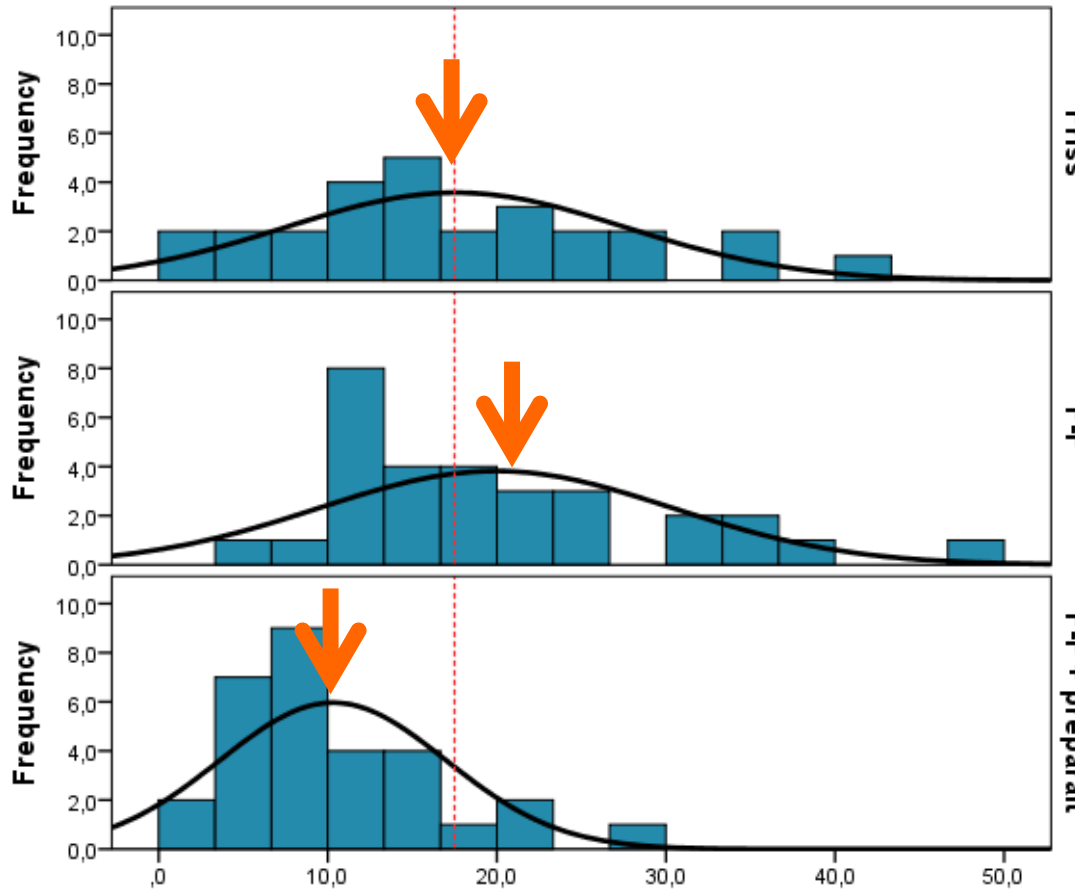


	Friss	Fagyasztott	Fagyasztott-preparált
Átlag:	24,5	24,7	12,1
Medián:	22,2	22,8	8,3

Friss minta DFI <15,3



	Friss	Fagyasztott	Fagyasztott-preparált
Átlag:	8,9	14,5	8,3
Medián:	9,2	12,3	6,9

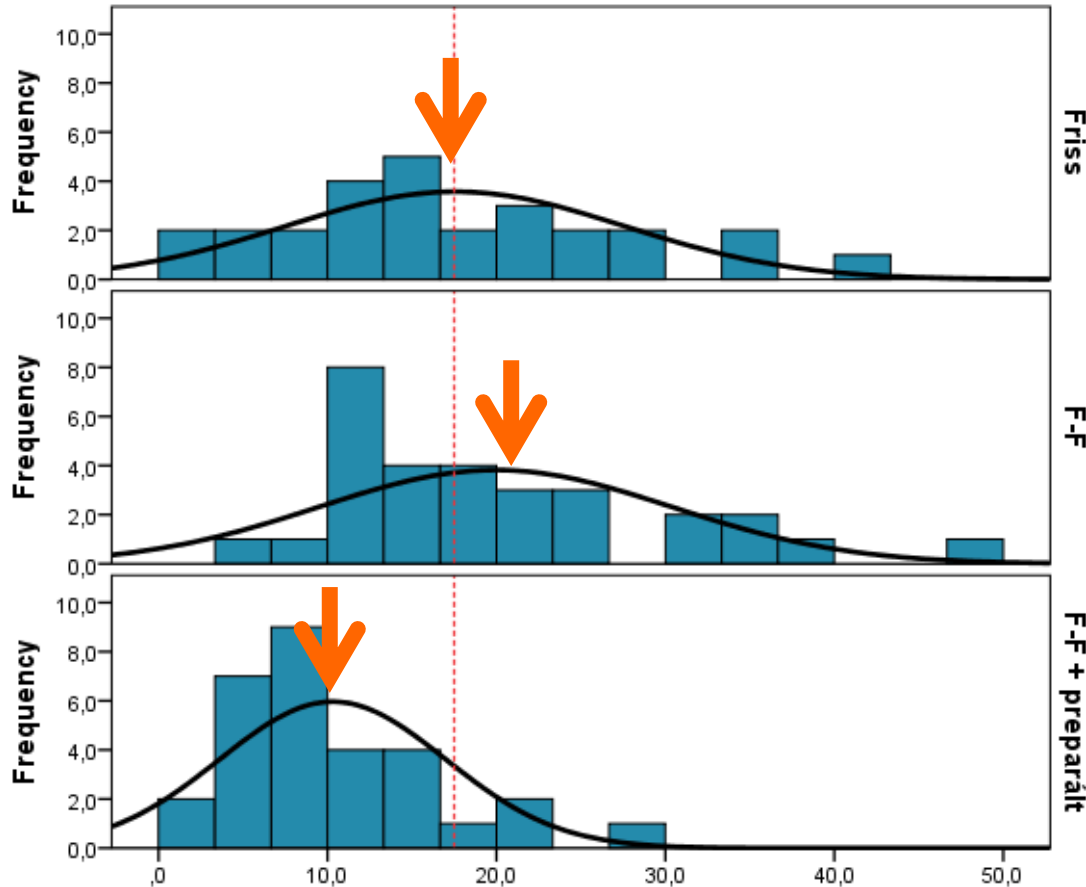


A friss miták  
átlag fragentáltsága

Eltolódás a  
fragmentáltabb  
tartományba

Eltolódás a kevésbé  
fragmentáltabb  
tartományba

# Vizsgálat eredménye 3.



Friss

Átlag: 17,5  
Medián: 15,5

Fagyasztott

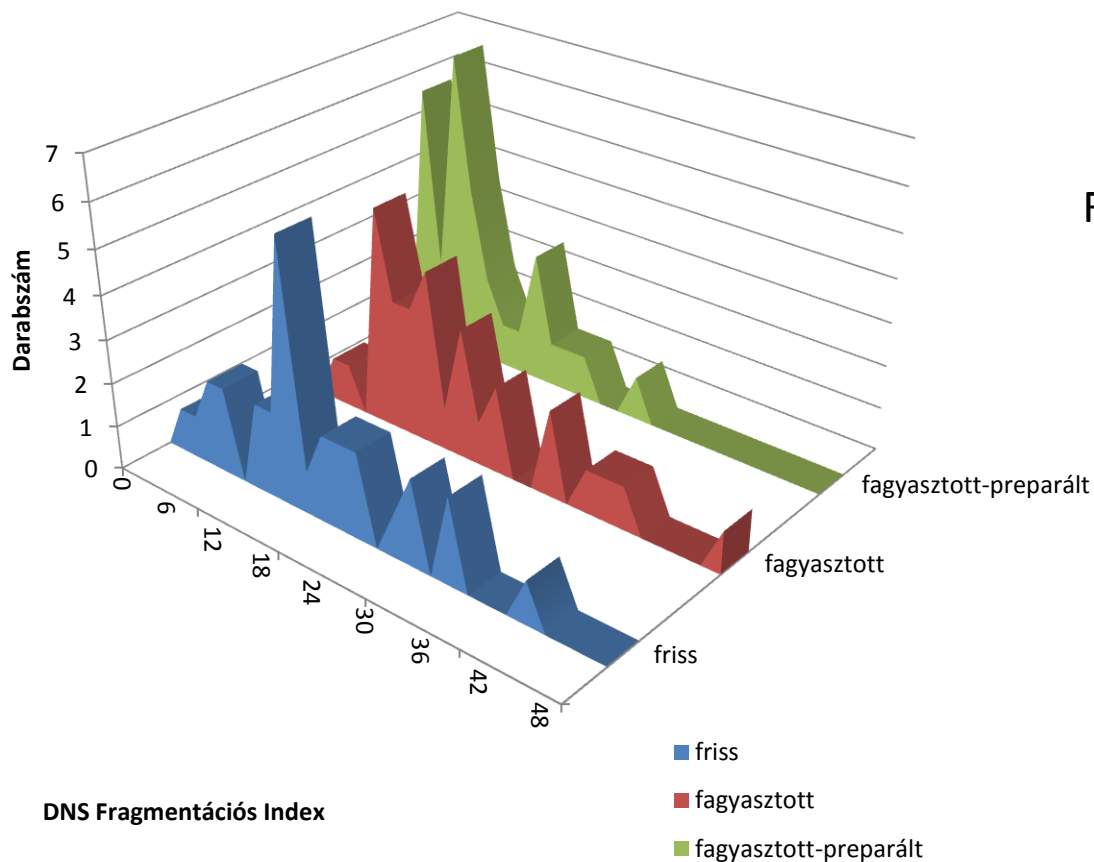
Átlag: 20,4  
Medián: 17,1

Fagyasztott  
preparált

Átlag: 10,2  
Medián: 7,8

n= 30

# Vizsgálat eredménye 3.



Fagyasztott preparált

Átlag: 10,2  
Medián: 7,8

Fagyasztott

Átlag: 20,4  
Medián: 17,1

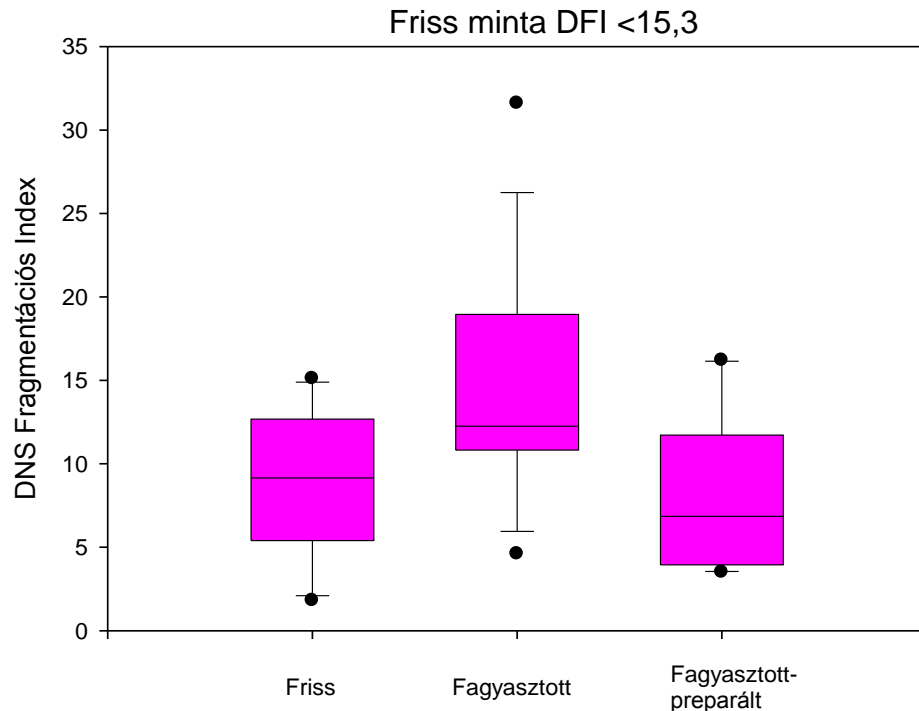
Friss

Átlag: 17,5  
Medián: 15,5

n= 30

# Tapasztalataink

Alacsony DNS fragmentációval rendelkező minták esetében

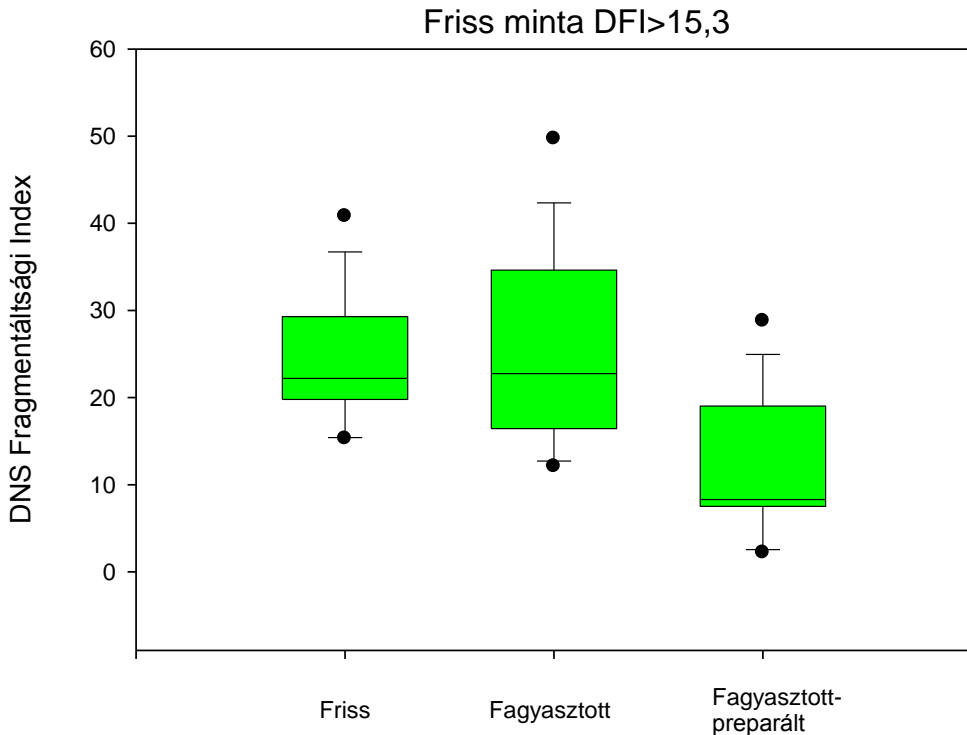


Átlag:	8,9	14,5	8,3
Medián:	9,2	12,3	6,9

- Fagyasztás során nő a spermiumok DNS fragmentációjának mértéke.
- Fagyasztás-felolvasztás-preparálás után a friss mintához hasonló fragmentációs értékeket mutatnak a minták.
- A ivarsejt donorjainkat vizsgálva szintén ebbe a tartományba tartoznak mintáink.

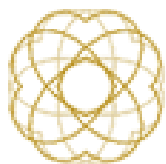
# Tapasztalataink

Magas DNS fragmentációval rendelkező minták esetében



Átlag:	24,5	24,7	12,1
Medián:	22,2	22,8	8,3

- Fagyasztás során nő a spermiumok DNS fragmentációjának mértéke.
- Fagyasztás-felolvasztás-preparálás után a friss mintához képest jelentős javulást (50-65%) mutatnak a minták.
- Eredményeink alapján a fragmentáltabb DNS-sel rendelkező mintákat termékenyítés előtt a sikeresebb beavatkozás érdekében hasznos lehet fagyasztani.



H U M A N C E L L  
EGÉSZSÉGÜGYI SZOLGÁLTATÁSOK

**KÖSZÖNÖM A FIGYELMET!**

