

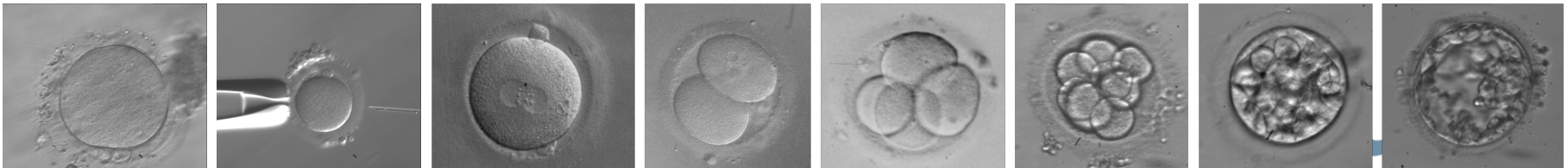
Flowcytometrie in Geassisteerde Voortplanting

Ilse Goovaerts, DVM, PhD
Klinisch Embryoloog
Centrum voor Reproductieve Geneeskunde
Universitair Ziekenhuis Antwerpen (UZA)

NVC-SKML congres 2018 Zwolle

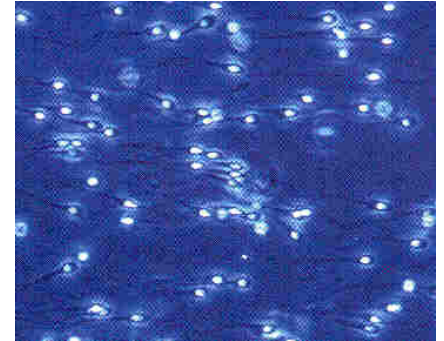


- Doel
 - Zwangerschap bij subfertiele koppels
 - Zwangerschap bij alleenstaanden / lesbische koppels (donor semen)
- Laboratorium:
 - Diagnose spermakwaliteit (aanbevelingen WHO)
 - Spermapreparatie voor intra-uteriene-inseminatie (IUI), in vitro fertilisatie (IVF) en ICSI (intracytoplasmatische sperma injectie)
 - Eicel pick-up, fertilisatie, embryocultuur, -evaluatie en -terugplaatsing
 - Invriezing van zaadcellen, eicellen, embryo's, testiculair- en ovariumweefsel
 - Weghalen van embryonale cellen voor genetische testen (PGT, PGS)



Sperma-analyse

- WHO aanbevelingen: drempelwaarden (fertiele mannen)
 - Motiliteit (manuele telling)
 - Vitaliteit (bij lage motiliteit)
 - Concentratie: telkamer
 - Morfologie: uitstrijkje – kleuring
 - Rondcellen – Witte bloedcellen vs. immature spermatogenetische cellen (peroxidase test)
 - Antisperma antilichamen
- ISO 15189 (International Standards Organization, 2012)
- Training in basic semen analysis (European Society for Human Reproduction and Embryology (ESHRE) Basic Semen Analysis Courses)
- Interne en externe kwaliteitscontrole-programma's (Institute of Public Health, Belgium and ESHRE External Quality Control Schemes, Sweden)



Sperma-analyse

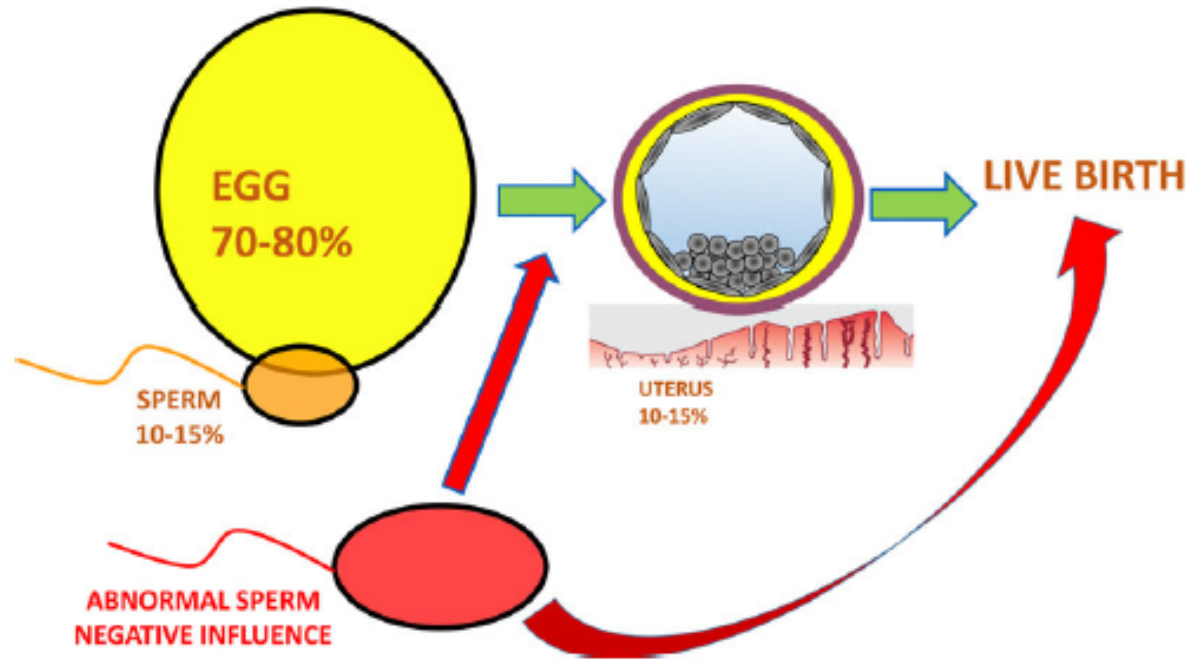


Figure 3 A schematic representing the hypothetical relative contributions of the egg, sperm and uterus to a successful live birth. The relative contribution of the sperm to a successful live birth can be hypothesized to be 10–15%. An euploidy and maternal age studies show that overall the egg's contribution is greater and could be hypothesized to be 70–80%, however when the paternal component is abnormal (red) it can drastically affect the ability of an embryo to reach the blastocyst stage and/or a fetus to develop and result in a live birth.

Sakkas et al., 2015



Sperma-analyse

- Ideopatische mannelijke infertiliteit (niet detecteerbaar met conventionele sperma-analyse)

- Meer aandacht voor man <-> ICSI

=> Nood aan het testen van de spermafunctie

DNA fragmentatie meest interessante (?)

Sperm DNA damage is a robust indicator of male infertility

(Evenson et al 1999; Nicopoulos et al 2008; Giwercman et al 2010)

Fertilization *in vitro* can be achieved with spermatozoa that would be rejected *in vivo*

Increased DNA damage has a negative effect on **embryo quality** (more fragmentation and apoptosis), gives more risk on **miscarriage**, more risk on **abnormalities** in the offspring, more chance on childhood cancer

(Aitken et al., 2013; Lewis et al., 2013).

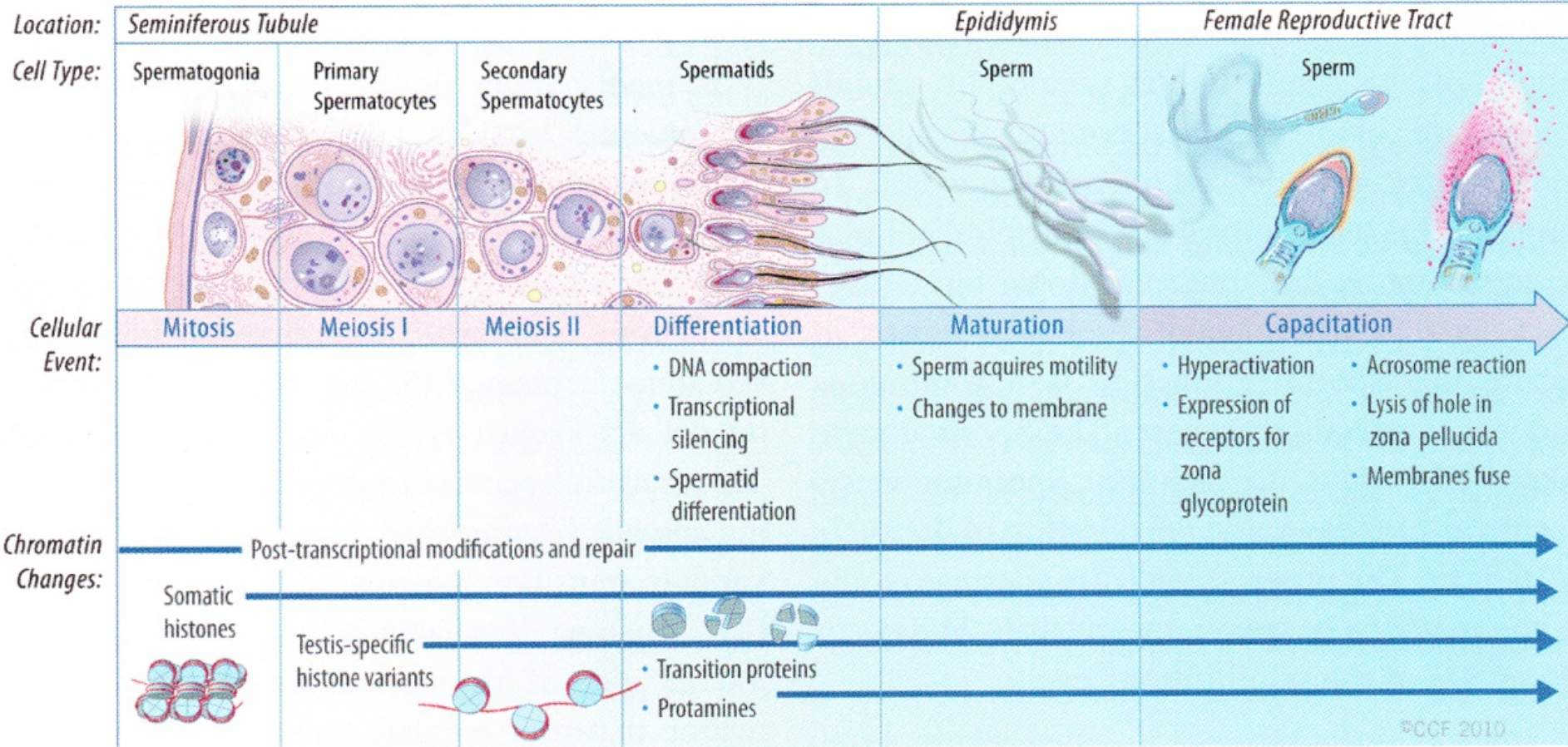
By using DNA compromised spermatozoa for ART, the long-term health & well being of children conceived by ART are being put at risk

(Ji et al 1997; Lee et al 2009; Wen et al 2012)



DNA fragmentation

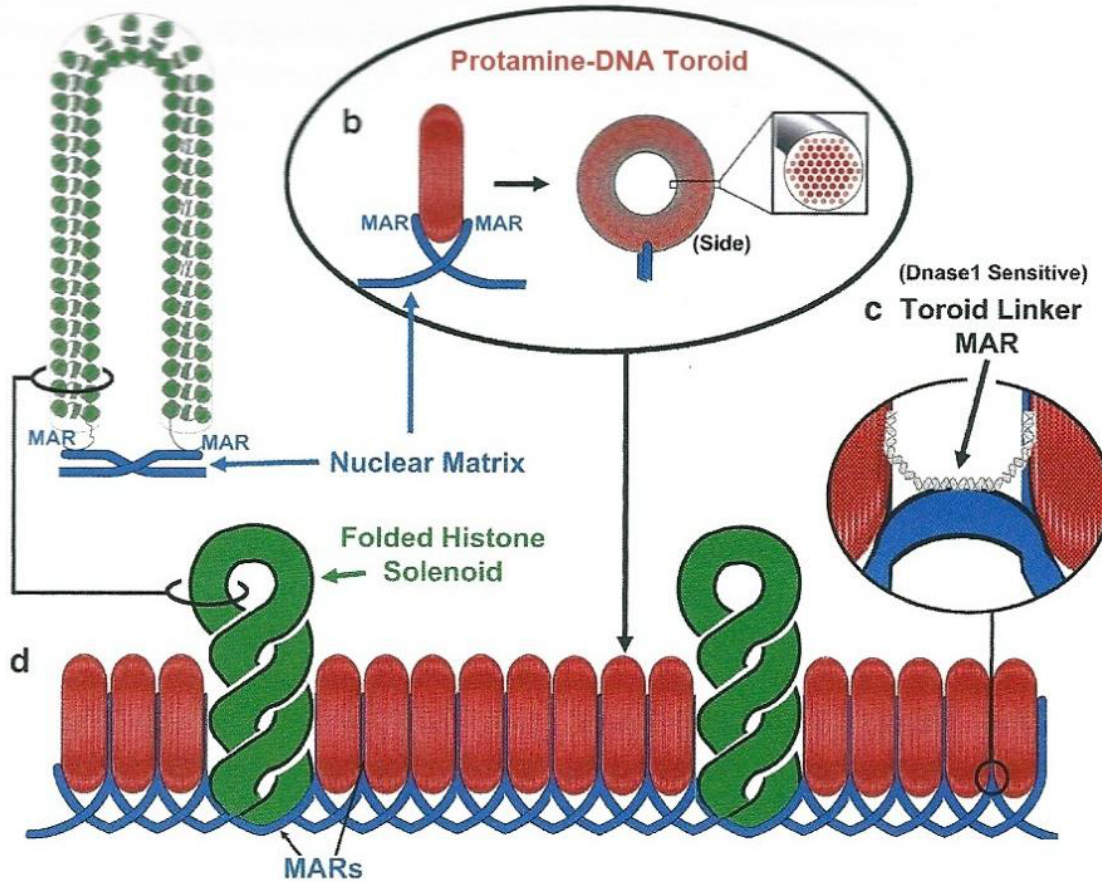
Sperm: Developmental Events



©CCF 2010



a Histone Solenoid



Ward 2010



Oxidatieve stress: hoofdoorzaak DNA fragmentation

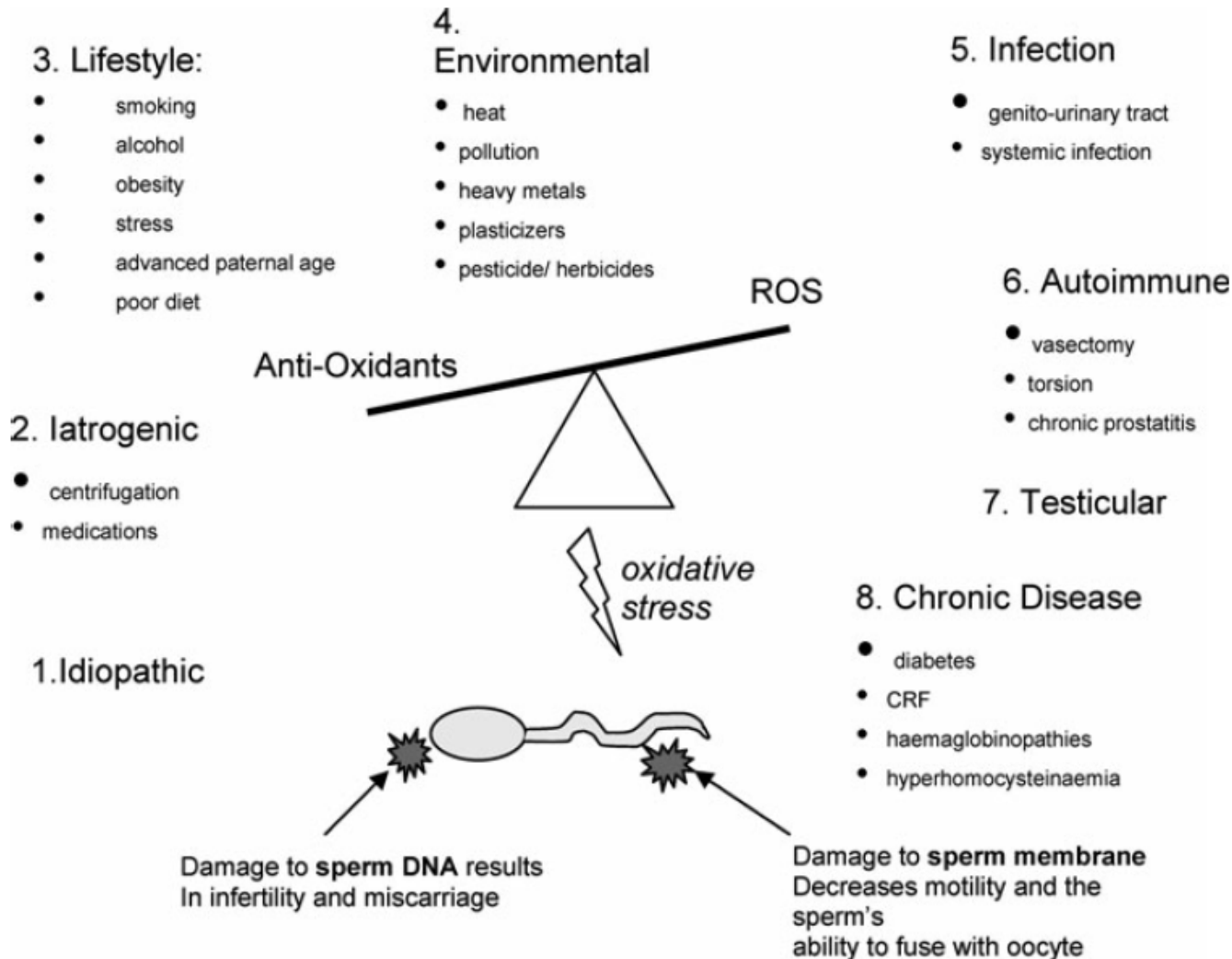


Figure 1: The oxidative stress balance.

Tremellen 2008

Verschillende manieren bepaling DNA fragmentatie

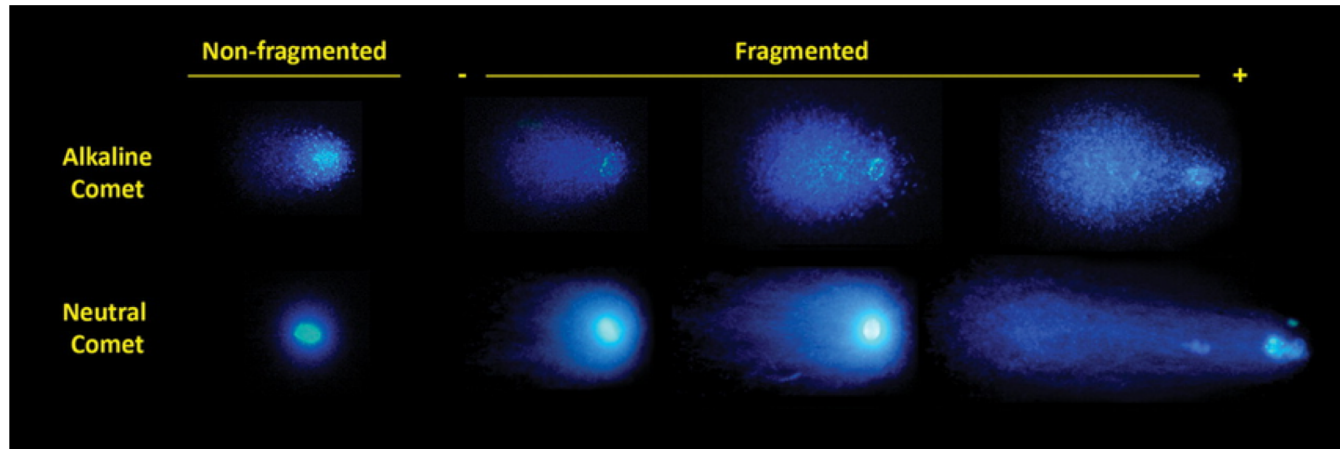
Single Cell Gel Electrophoresis (COMET) Assay: kleinere DNA stukken: grotere

'komeet':

Subjectief

Computer

analyse



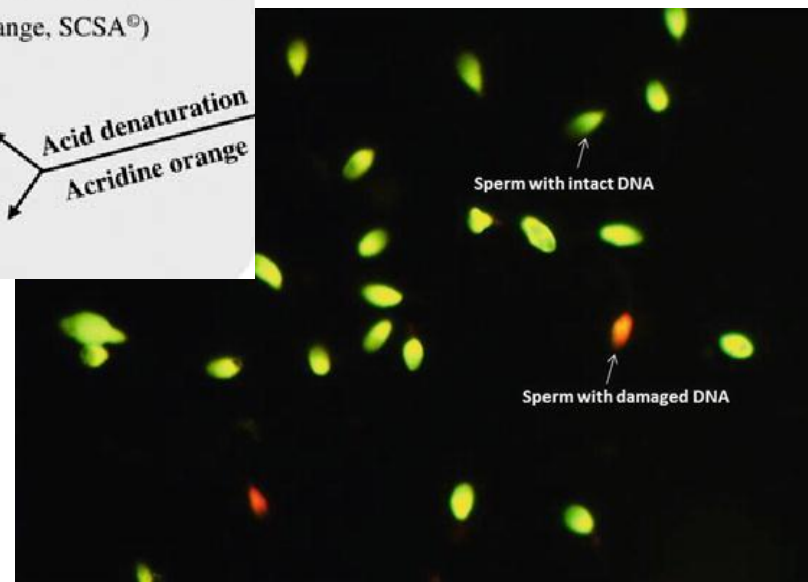
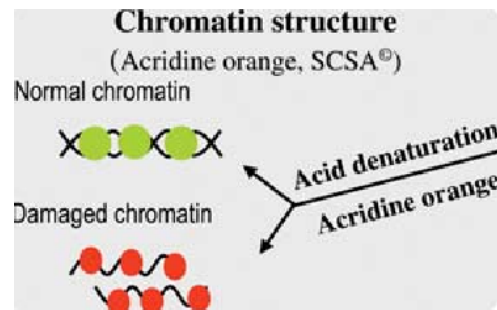
Sperm Chromatin

Structure Assay (SCSA): kleinere

stukken reageren anders op zuur

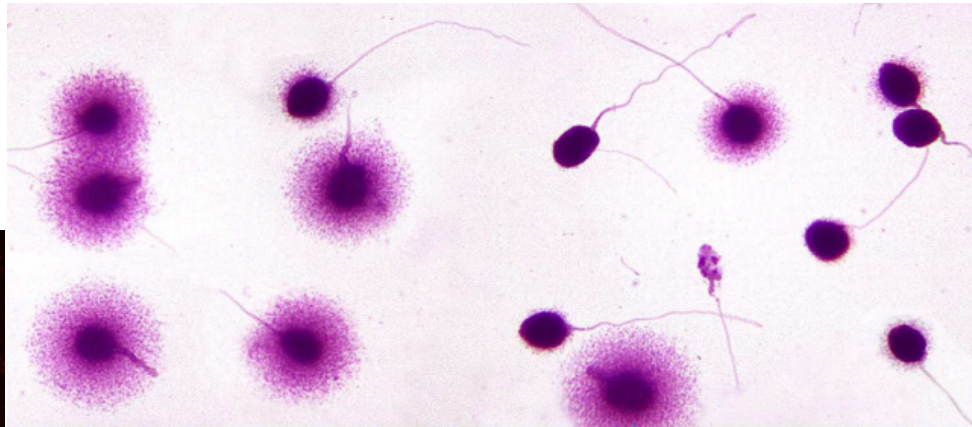
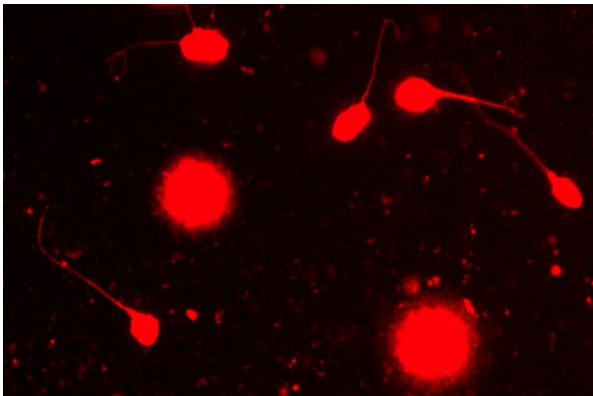
+ acridine oranje: flowcytometrie

Indirecte methode



Verschillende manieren bepaling DNA fragmentatie

- Sperm Chromatin Dispersion (SCD) Test
- Denaturatie met zuur – verwijderen van nucleaire proteïnen – kleuring (lichtmicroscopie of fluoresceentiemicroscopie)
- Sperma met gefragmenteerd DNA kan geen halo creëren van verspreide DNA lussen
- Halo: geen fragmentatie
- Geen halo: fragmentatie



Verschillende manieren bepaling DNA fragmentatie

- Terminal deoxynucleotidyl transferase (TdT)–mediated fluorescein–dUTP nick end labeling (TUNEL)
- Directe test

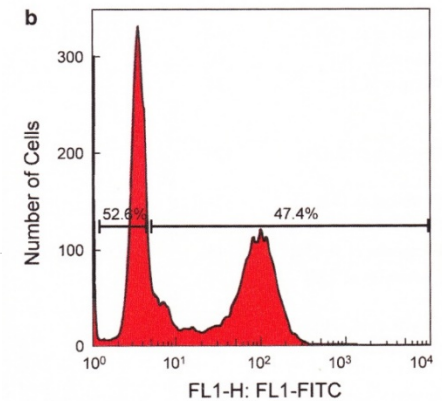
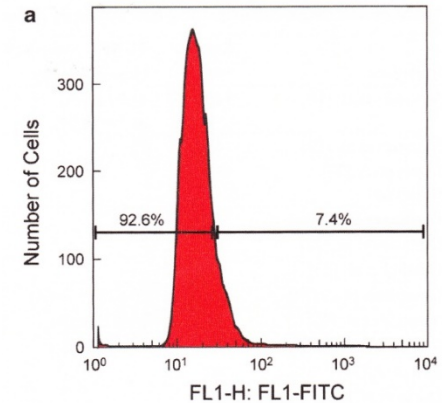
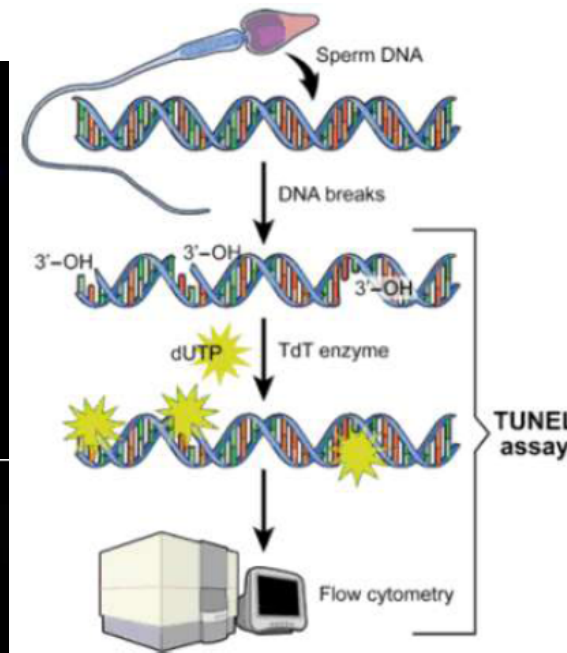
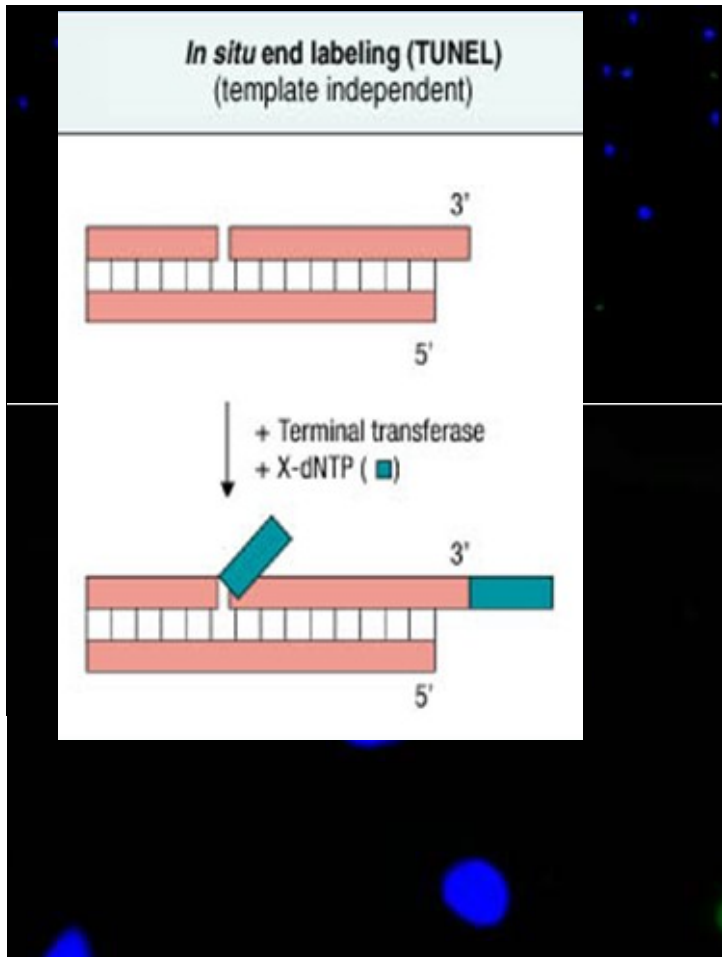


Fig. 14.3 Representative histogram showing (a) TUNEL negative and (b) TUNEL positive sample

TUNEL assay (Mitchell *et al* 2010)

1. LIVE/DEAD® Fixable Far Red Dead Cell Stain (Molecular Probes, Life Technologies): covalente binding met intracellulaire amines van dode cellen
2. Decondensatie: met dithiothreitol (DTT): vergemakkelijkt de aanhechting aan DNA-breuken
3. Fixatie (formaldehyde) en permeabilisatie (Triton-X en natriumcitraat)
4. TUNEL reactie: gelabelde dUTP aan 3'-OH end breuken gefaciliteerd door TdT enzyme (Roche of BD kit)

Diagnose: op natief spermastaal (2x gewassen).

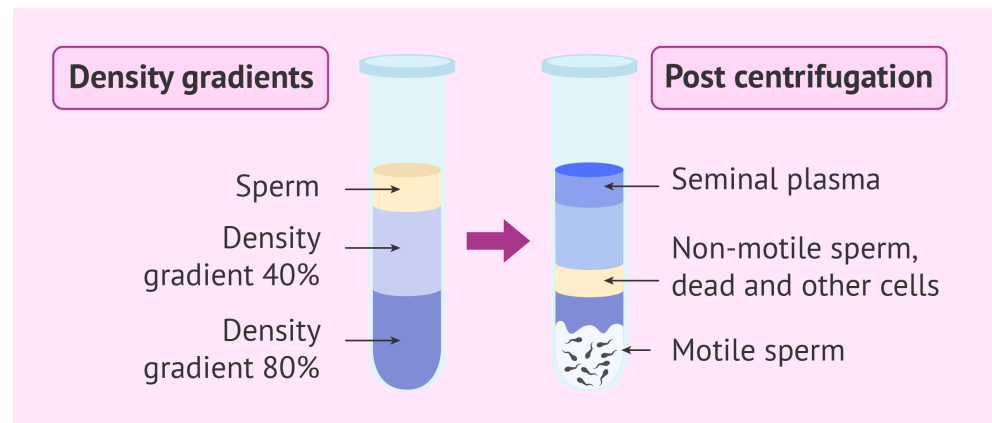
Therapie: na sperma-preparatie: gradiënt: voorspelling op ART succes.

DNA totaal – natief ejaculaat

DNA vitaal – natief ejaculaat

DNA totaal – gradiënt

DNA vitaal – gradiënt





- Vorm van zaadcellen: asymmetrisch hoofd en staart
- Plakkerig (cleaning procedure)
- Niet bruikbaar voor alle stalen:
 - (extreme) oligospermia (lage concentratie)
 - hoge viscositeit
- Aanwezigheid van debris, rondcellen (leucocyten, spermatogenetische cellen)
- Juiste herkenning spermatozoa / onderscheid van andere partikels
- Setting verschillend tussen labo's (validatie op labo-niveau ↔ WHO)
- Kosten alleen mogelijk voor gespecialiseerde labo's (BE: geen terugbetaling)
- Opgeleid personeel nodig

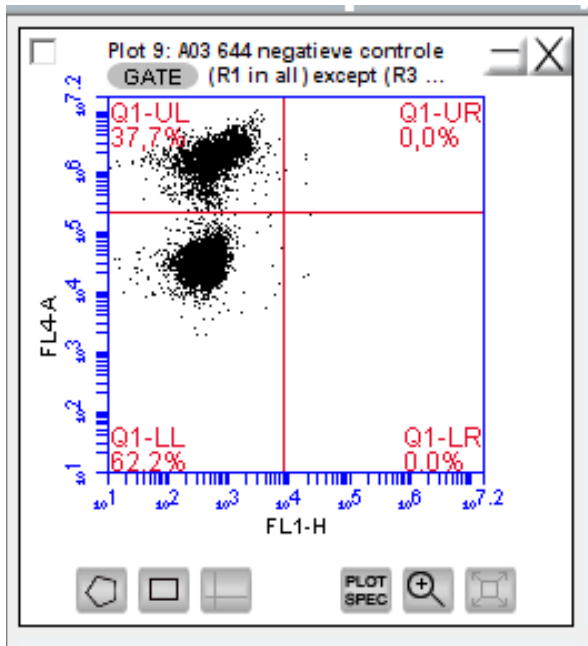


Setting: BD Accuri C6 en Accuri C6 plus

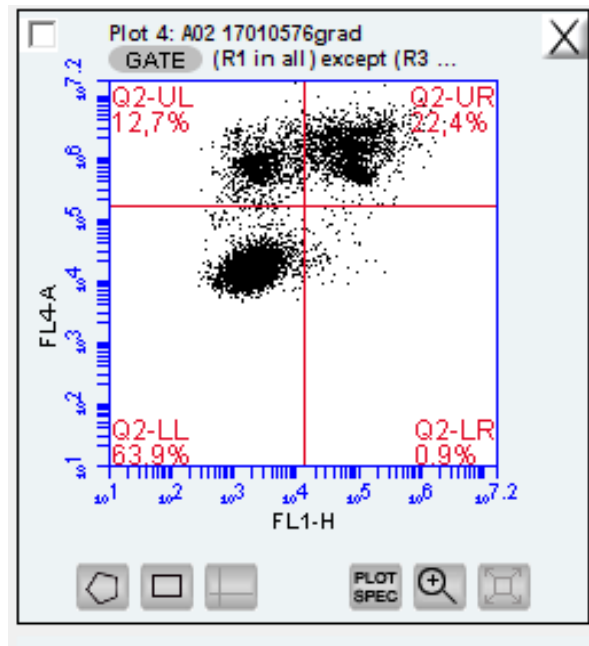


FL1 (488): 533/30 nm BP: FITC (TUNEL)
FL4 (640): 675/25 nm BP: APC (LIVE/DEAD)
5000 – 10 000 events per staal
flow rate: 35 μ l / min.

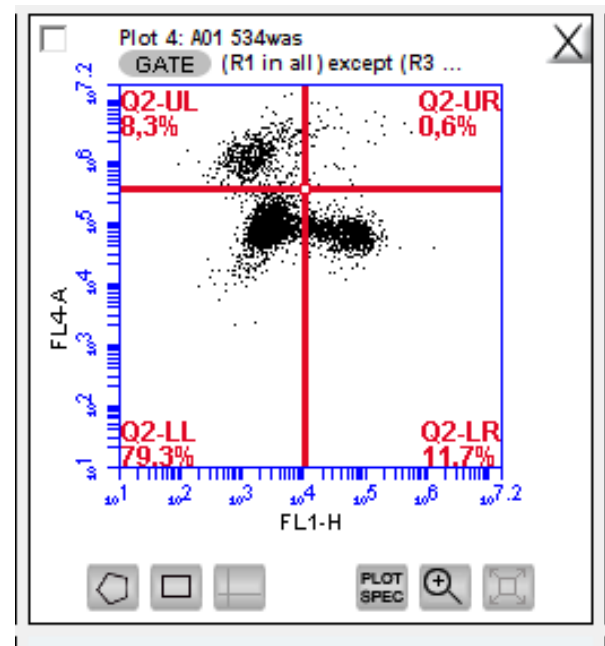
Resultaten



Negatieve controle



Positief in totaal,
niet in vitale deel



Positief in vitale
deel



Resultaten

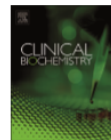
Clinical Biochemistry xxx (xxxx) xxx-xxx



Contents lists available at ScienceDirect

Clinical Biochemistry

journal homepage: www.elsevier.com/locate/clinbiochem



Sperm DNA density gradient centrifugation

U. Punjabi*,
D. De Neubergh

Centre for Reproductive Medicine

ARTICLE INFO

Keywords:

Total sperm DNA fragmentation
Vital sperm DNA fragmentation
TUNEL assay
Density gradient centrifugation

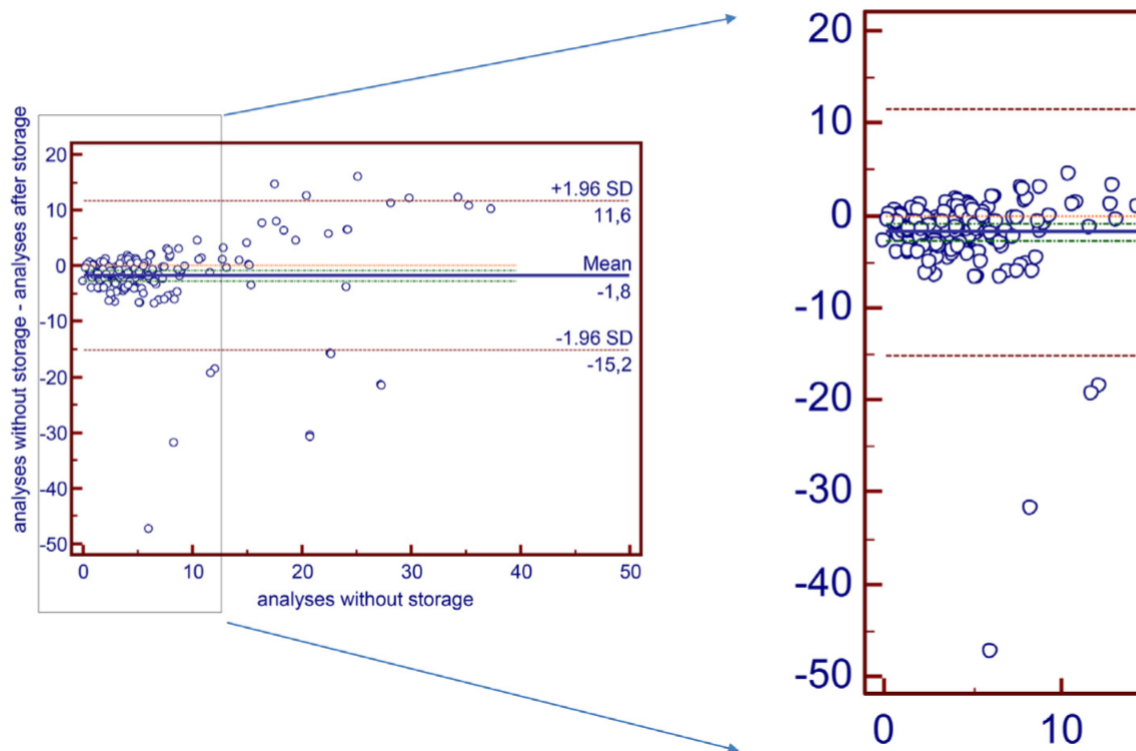
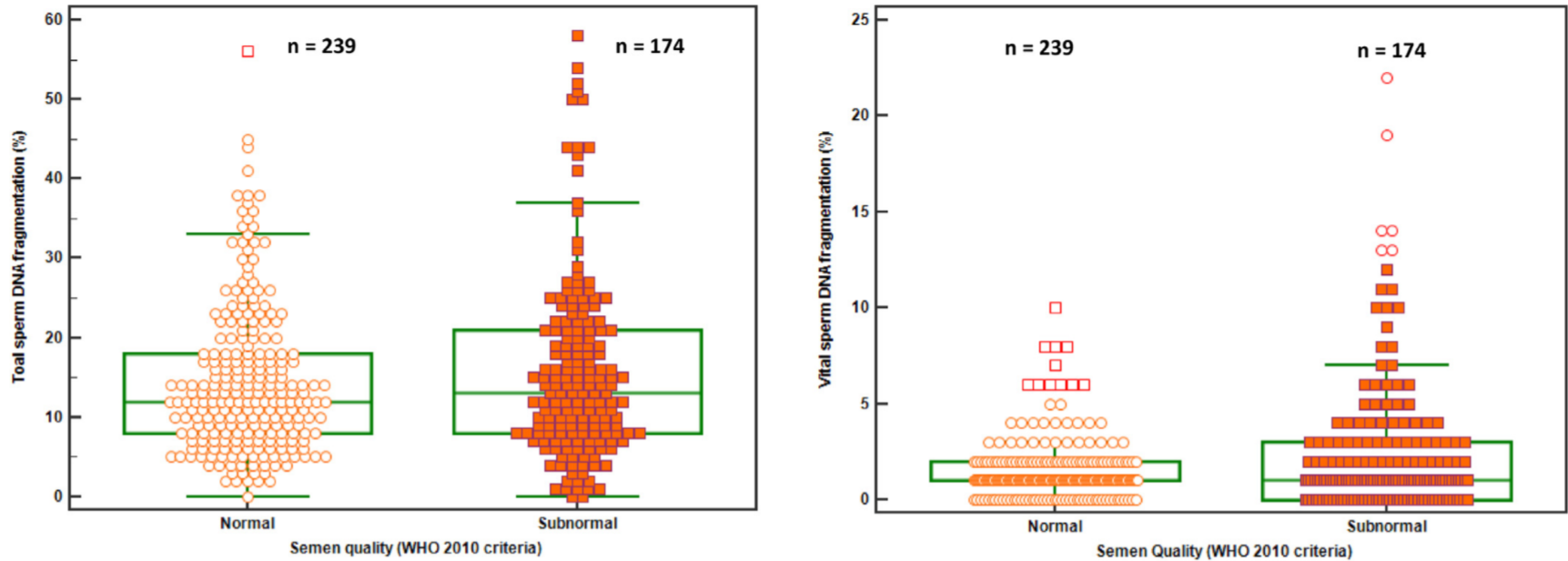


Fig. 1. Bland and Altman plot showing magnitude of variation between samples analyzed directly and the same samples stored and further analyzed.

Alle analyses dienen uitgevoerd te worden op verse spermastalen – ongeveer 1 uur na productie (cfr WHO aanbevelingen spermamotiliteit en -vitaliteit) in agreement Muratori et al., 2010; Curi et al., 2012



Resultaten ~ sperma parameters (WHO)



Legend: n = number of patients

Fig. 2. Sperm DNA fragmentation in the total and the vital fractions in neat semen of patients with normal & subnormal semen parameters (WHO 2010 criteria).

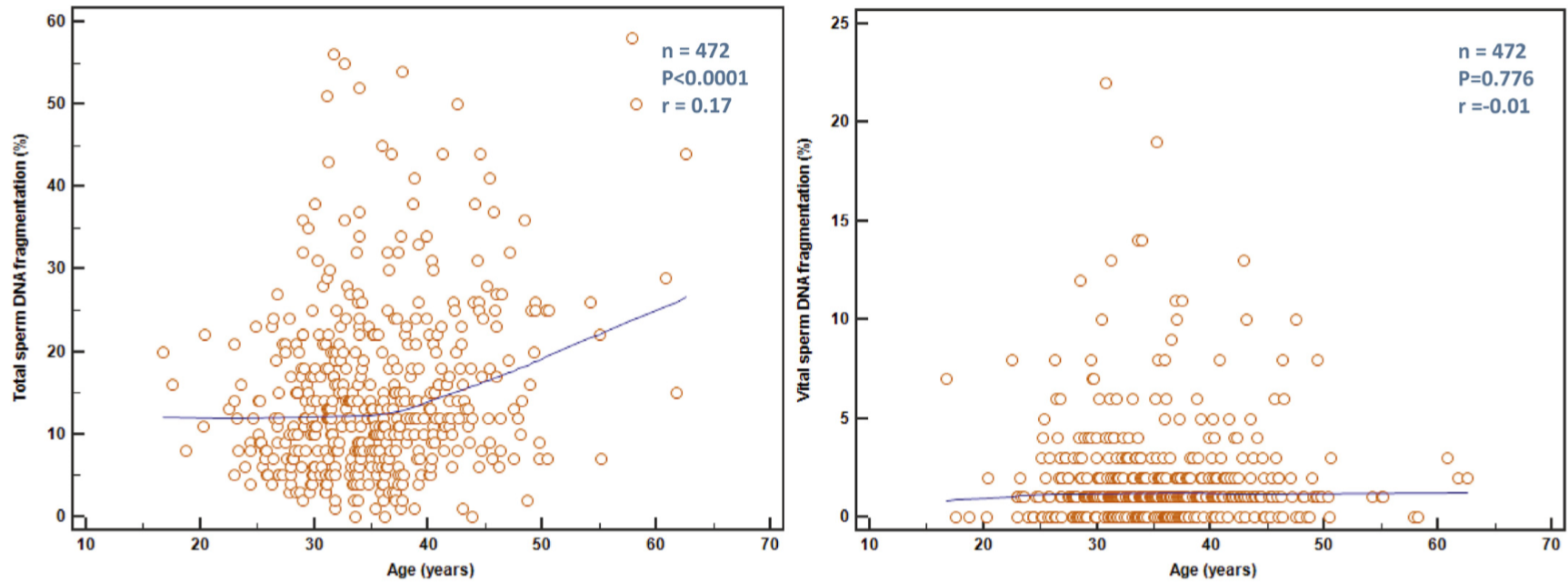
→ Conventionele sperma parameters kunnen DNA schade niet voorspellen

DNA fragmentatie & conventionele sperma parameters in natief semen:

- ↓ motility ↑ totale DNA fragmentatie
- ↓ totale sperma aantal ↑ vitale DNA fragmentatie
- ↑ leucocyten ↑ vitale DNA fragmentatie
- ↑ immature spermatogenetische cellen ↑ vital DNA fragmentation



Resultaten: leeftijd

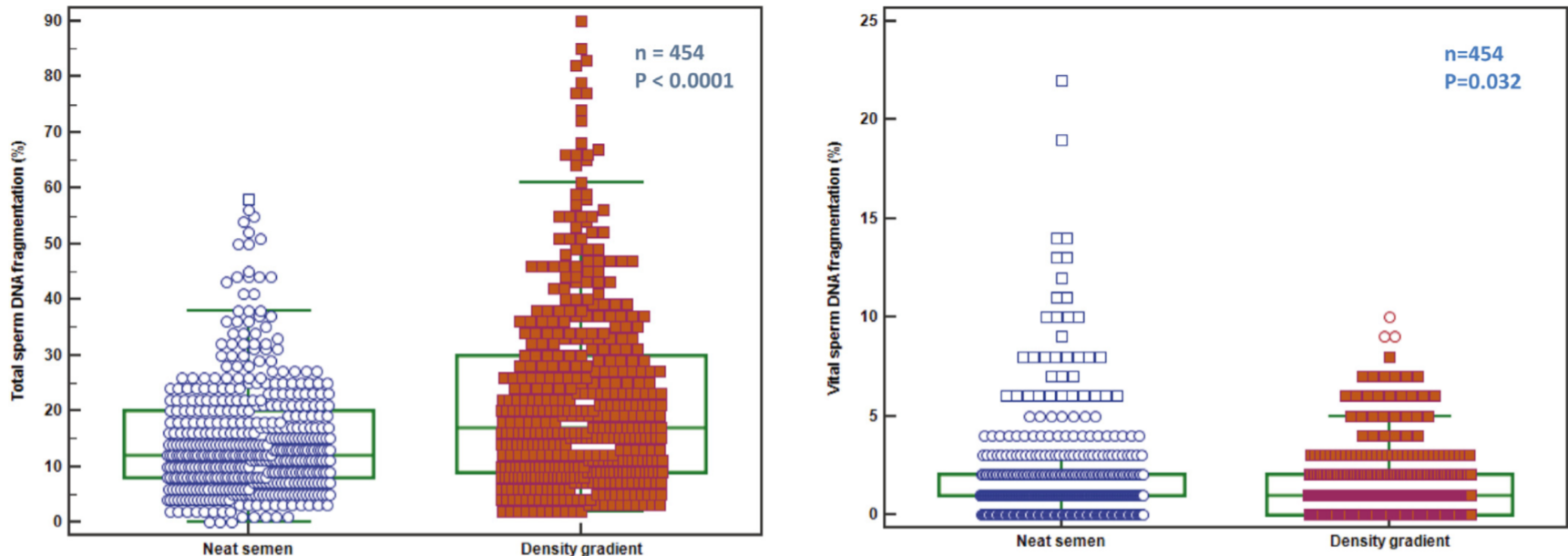


Legend: n = number of patients; P = value of significance; r = correlation coefficient

Fig. 5. Sperm DNA fragmentation in the total & vital population in neat semen when correlated with age.

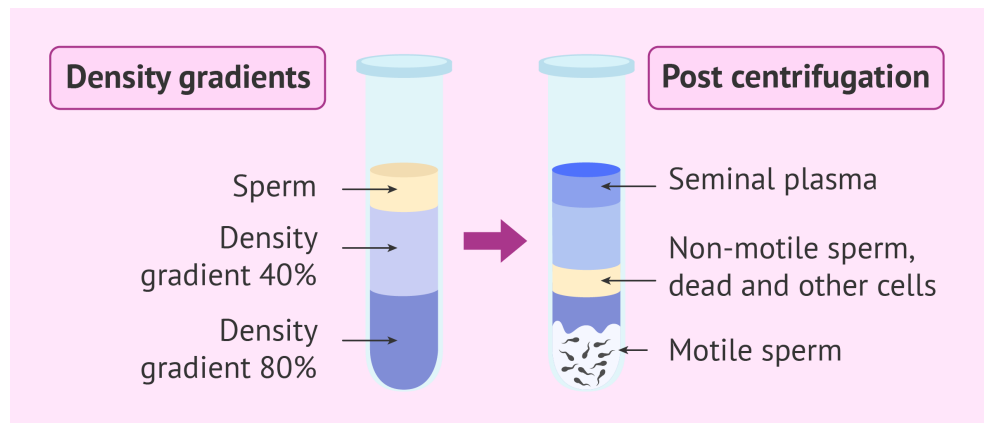


Resultaten: opwerking semen



Legend: n = number of patients; P = value of significance

Fig. 4. Sperm DNA fragmentation in the total & vital fractions before & after density gradient centrifugation.



Klinisch belang DNA fragmentatie test

- Hoge DNA fragmentatie: androloog (infectie, varicocoele,...)
- Oxidatieve stress meting: welke mannen zijn gebaat met anti-oxidant behandeling
- Grant: TBM project: How does detection of DNA damage in sperm influence the patient's chance of conception? € 679 512
 - IUI slechts 14% zwangerschapspercentage
 - Invloed van DNA
 - Beter onmiddellijk IVF/ICSI (30-35% zwangerschapspercentage)



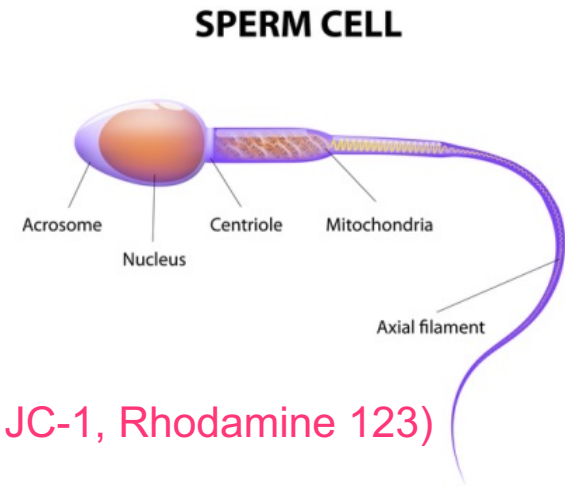
Flowcytometrie in andrologie (1)

- Sperma concentratie: debris interfereert en bias resultaten (overschatting):
combineren gating op celgrootte, granulariteit, DNA kleuring (haploïde cellen)
- Viabiliteit: SYBR-14/PI, Yo-Pro 1, SNARF-1, 7-amino-actinomycin D (7-AAD)
- Capacitatie: som van reacties nodig voor fertilisatie, bv.
 - Cyclisch AMP↑
 - Lipide membraan: phosphatidyl serine (PS) residues exposure (merocyanide 540, Annexin V: PS ook marker apoptosis: membraan degeneratie)
 - Permeabiliteit voor calcium↑ (Fluo-3AM, Indo)
 - Oppervlak tyrosine fosforylatie (fluorochrome-conjugated anti-phosphotyrosine antibodies)
 - Veranderingen in coating (fluorochrome-conjugated lectins)



Flowcytometrie in andrologie (2)

- Acrosoomreactie: exocytose van enzymen (Golgi) om zona pellucida te penetreren (eicel coating) (fluorochrome-conjugated lectins, f.e. *pisum sativum agglutinin*, bindt binnen in de acrosome; LysoTracker®)
- Sperma mitochondriale status (MitoTracker Green, JC-1, Rhodamine 123)
- Apoptose: Annexin V/PI: vroege apoptose + membraan intactheid; TUNEL: late apoptose
- Oxidatieve stress en lipide peroxidatie: MitoSOX: mitochondrial superoxide; BODIPY (ROS attack phospholipids); 8-hydro-geoxyguanosine (metaboliet van DNA damage door oxidative stress)



Flowcytometry in andrologie (3)

- Leucocyten: WHO: peroxidase pos \neq all leucocytes
 - CD18, CD45, II-1 β , TNF- α , II-6,..
- Sperm sorting technologie: aanpassingen (asymmetrisch, kop + staart)
 - sperma sexing: meer DNA in X chromosome
 - Fokprogramma's dierlijke industrie (melkvee, bedreigde diersoorten)
 - Bevruchtingsresultaten \downarrow (high speed sorting, verhoogde druk)
 - Mens: volgens wet enkel voor genetisch geslachtsgebonden afwijkingen (niet toegepast)
- Spermatogenetische cellen detectie wanneer geen zaadcellen in testculair weefsel (prepubertaire jongens, Klinefelter (XXY))
 - Vimentin: somatische cellen
 - γ H2AX: spermatogenetische cellen



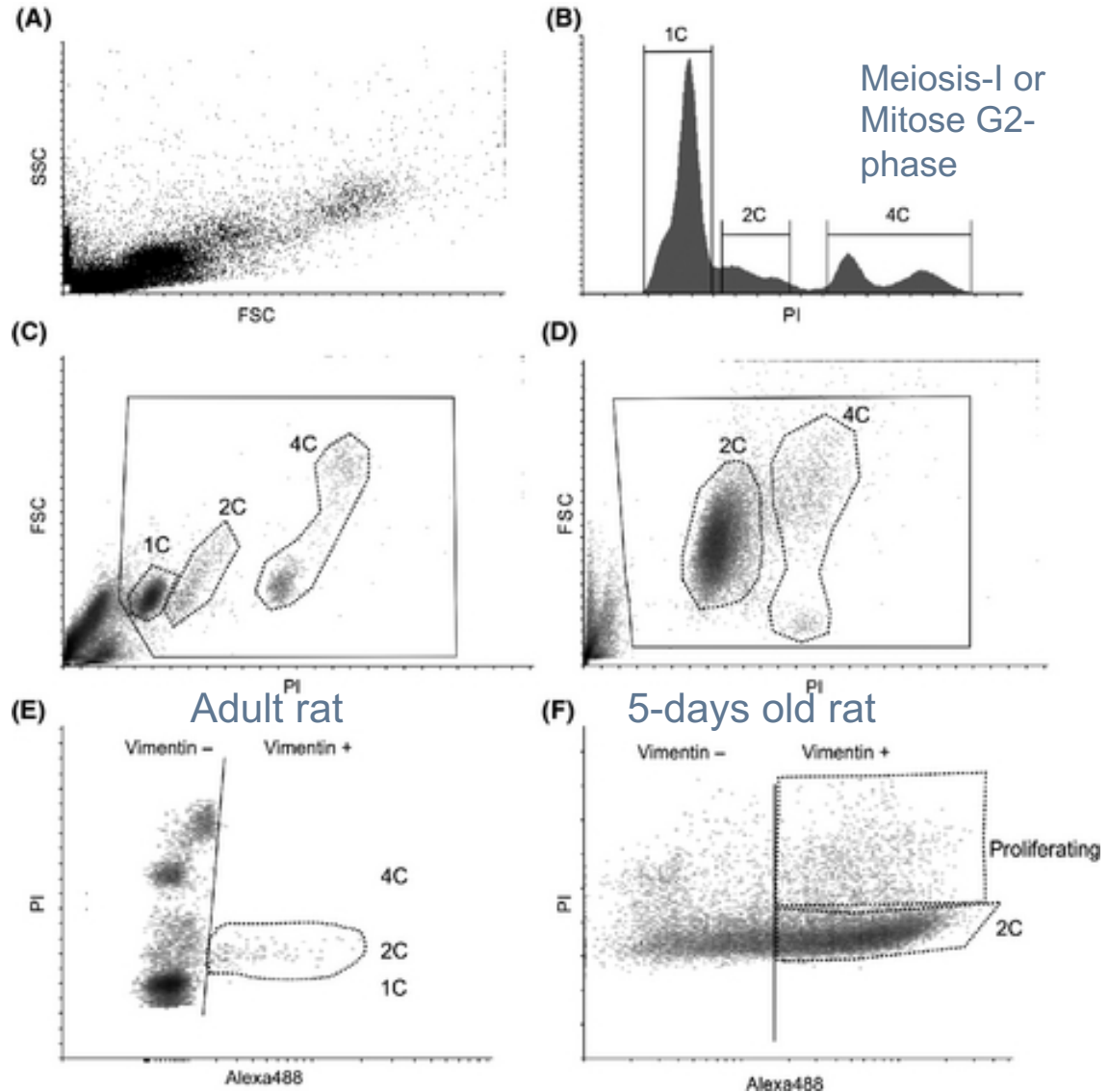
Flowcytometry in andrologie (4)

Complexiteit morfologie:
FSC/SSC-plot \neq ok

Ploidy analyse

tetraploid, diploid, haploid

Not directly useful for ICSI








Bedankt voor jullie aandacht



Flowcytometrie in vrouwelijke (onco)fertiliteit

-  Oocyte
-  Early Granulosa cell
-  Granulosa Cell
-  Theca Cell

