

EGYETEMI DOKTORI (Ph.D.) ÉRTEKEZÉS

**Az infertilitás háttérében álló genetikai eltérések vizsgálata
és klinikai jelentősége**

Mokánszki Attila

Témavezető: Prof. Dr. Oláh Éva



DEBRECENI EGYETEM

KLINIKAI ORVOSTUDOMÁNYOK DOKTORI ISKOLA

DEBRECEN, 2013

Tartalomjegyzék

1. BEVEZETÉS.....	7
2. IRODALMI ÁTTEKINTÉS.....	8
2.1. Az infertilitás meghatározása és előfordulási gyakorisága.....	8
2.2. A férfi nemzőképtelenség genetikai okai.....	9
2.2.1. Kromoszóma eltérések.....	10
2.2.2. Az Y kromoszóma hosszú karjának deléciói.....	11
2.2.3. Az SRY gén.....	13
2.2.4. Génmutációk.....	13
2.2.4.1. Kallmann-szindróma.....	13
2.2.4.2. Az androgén inszenzitivitási szindróma.....	14
2.2.4.3. Cisztás fibrózis.....	15
2.2.4.4. A gonadotróp hormonokat kódoló gének mutációi.....	16
2.2.5. A spermiumok genetikai eltérései.....	16
2.2.5.1. A spermiumok aneuploidiaja.....	16
2.2.5.2. A spermiumok hialuronsav kötő képessége.....	17
2.2.5.3. Non-diszjunkció – kromoszómák szegregációja okozta kiegyensúlyozatlan kromoszóma készlet.....	17
2.3. A női infertilitás leggyakoribb genetikai okai.....	18
2.3.1. Kromoszóma eltérések.....	19
2.3.2. Génmutációk.....	20
2.4. Célkitűzések.....	21
3. BETEGEK ÉS MÓDSZEREK.....	23
3.1. A vizsgálatban résztvevők.....	23
3.1.1. A vizsgált infertilis férfiak és nők.....	23

3.1.2. Kontroll csoportok.....	24
3.2. Vizsgálati módszerek.....	26
3.2.1. Citogenetikai és FISH vizsgálat.....	26
3.2.2. DNS izolálás.....	27
3.2.3. Az Y kromoszóma AZF régiójának vizsgálata.....	28
3.2.4. Spermiumok hialuronsav-kötő képességének vizsgálata.....	29
3.2.5. Spermiumok FISH vizsgálata.....	29
3.2.6. Az <i>FMR1</i> gén vizsgálata.....	31
4. EREDMÉNYEK.....	33
4.1. Citogenetika és molekuláris citogenetika.....	33
4.2. Az Y kromoszóma AZF régiójának vizsgálata.....	35
4.3. Spermiumok hialuronsav-kötő képességének vizsgálata.....	38
4.4. A spermiumok kromoszóma aberrációinak meghatározása.....	39
4.5. Összefüggés a spermium koncentráció, a hialuronsav-kötődési képesség és a becsült számbeli kromoszóma aberráció gyakoriság között.....	43
4.6. Szegregációs analízis.....	45
4.7. Az <i>FMR1</i> gén vizsgálata.....	49
5. MEGBESZÉLÉS.....	51
5.1. Kromoszóma szintű eltérések férfi infertilitásban.....	51
5.2. Kromoszóma szintű eltérések női infertilitásban.....	55
5.3. Az Y kromoszóma AZF régiójának deléciói.....	58
5.4. Spermiumok hialuronsav-kötő képessége.....	61
5.5. A spermiumok kromoszóma aberrációi.....	63
5.6. Összefüggés a spermium koncentráció, a hialuronsav-kötődési képesség és a becsült számbeli kromoszóma aberráció gyakoriság között.....	66

5.7. Kiegyensúlyozott transzlokációt hordozó infertilis férfiak spermium sejtjeinek szegregációs analízise.....	68
5.8. Az <i>FMR1</i> gén tripletexpánziója korai ovárium elégtelenségben.....	70
5.9. Legfontosabb megállapításaim.....	71
6. ÖSSZEFOGLALÁS/ SUMMARY.....	73
7. IRODALOMJEGYZÉK.....	75
8. TÁRGYSZAVAK.....	96
9. KÖSZÖNETNYÍLVÁNÍTÁS.....	97

Rövidítések jegyzéke

AR gén: androgén receptor gén

AZF: azoospermia faktor

CBAVD: kongenitális bilaterális vas deferens hiány

CFTR gén: cisztás fibrózis transzmembrán regulátor fehérje gén

CK: kreatin kináz

CUAVD: kongenitális unilaterális vas deferens hiány

DAZ gén: deleted in azoospermia gén

DTT: ditiotritol

FISH: fluorescens in situ hibridizáció

FMR1 gén: fragilis X mentális retardáció gén

FSH: luteinizáló hormon

GnRH: gonadotropin-releasing hormon

HA: hialuronsav

HBA-teszt: hialuronsav-kötő teszt

HspA2: a spermiumokban termelődő hő sokk fehérje típus

ICE: interchromosomal effect, interkromoszomális hatás

ICSI: intracitoplazmatikus spermium injektálás

IVF: *in vitro* fertilizáció

KAL1 gén: a Kallmann szindróma génje, anosmin-1

LH: luteinizáló hormon

LIS: litium-dijódszalicilát

MAIS: mild androgen insensitivity syndrome, az androgén inszenzitivitási szindróma enyhe formája

PAR: pszeudoautoszomális régió

PCR: polimeráz láncreakció

PHA: fitohemagglutinin

PGD: preimplantációs genetikai diagnosztika

POF: korai ováriumelégtelenség

SBMA: spinális és bulbáris muszkuláris atrófia

SCO: Sertoli Cell Only szindróma

SHOX gén: short stature homeobox gén

SRY gén: az Y kromoszóma szex determinációért felelős génje

STS: sequence tagged site

TESE: tesztikuláris spermium extrakció

ZFY gén: az Y kromoszómán lévő cink-ujj fehérjét kódoló gén

1. BEVEZETÉS

A fejlett országok (Európa és Észak Amerika) népessége különböző társadalmi, szociális és gazdasági tényezők miatt csökken, kisebb a gyermekvállalási kedv és nő a halálozási ráta. A kevesebb gyermek születéséhez jelentős mértékben hozzájárul a magas infertilitási arány, a mortalitási értékek növekedésében pedig a szív és érrendszeri, valamint a daganatos megbetegedések játszanak döntő szerepet. Magyarországon a nyolcvanas évek elején kezdődött a népesség számának csökkenése. Az ezredforduló után a magyar népesség évente 40 ezer fővel csökkent, mára tíz millió alá esett hazánk lakóinak száma. A népességcsökkenés hátterében számos ok állhat: megváltozott társadalmi szokások (a nők foglalkoztatása, a nem házasságban élők és a válások nagy száma), romló szociális helyzet. Mindezek mellett fontos születési arányszámot csökkentő tényező a meddő házaspárok nagy száma, a mesterséges reprodukciós technikák gyakori ismételt sikertelensége a nem megfelelő beágyazódás, illetve korai vetélések miatt, ami jelentősen csökkenti a párok gyermekvállalási kedvét.

A fejlett országokban a meddő házaspárok aránya 10-15%, az esetek felének hátterében genetikai eltérés állhat. Ezek vizsgálata napjainkban egyre nagyobb jelentőséget nyer, több ma már a rutin diagnosztika részévé vált. A genetikai vizsgálat jelentősége, hogy az eltérések tisztázásával az esetek jelentős részében adatot nyerhetünk az utód genetikai kockázatáról, az asszisztált reprodukció várható sikerességéről, útmutatást kapunk a legcélravezetőbb módszer megválasztásához, esetleg donor spermium/petesejt szükségességének megítéléséhez. Fontos annak elérése, hogy a genetikai vizsgálatokra az *in vitro* fertilizáció (IVF) elvégzése előtt, ne csupán több sikertelen próbálkozás után kerüljön sor. Sikeres IVF után nagyobb a genetikailag rendellenes utód születésének kockázata. A genetikai okok ismeretében a nagy genetikai kockázatú esetekben preimplantációs vagy prenatalis vizsgálattal megelőzhetjük károsodott gyermek születését.

2. IRODALMI ÁTTEKINTÉS

2.1. Az infertilitás meghatározása és előfordulási gyakorisága

Az infertilitás fogalomkörébe tartoznak a férfi és női eredetű meddőség különböző formái, valamint az ismétlődő vetélések, amennyiben ezek háttérében nem deríthető ki egyértelmű nőgyógyászati, vagy andrológiai tényező. Infertilitásról beszélünk, ha rendszeres, fogamzásgátlástól mentes házasság ellenére egy év alatt nem következik be terhesség (Foresta és mtsai, 2002). Amennyiben előzőleg sem jött létre terhesség, primer infertilitásról, amennyiben az anamnézisben szerepel terhesség, szekunder infertilitásról van szó. Ismétlődő vetélésről két, vagy több vetélés/magzati elhalás esetén beszélünk. A kutatási eredmények alapján megállapítható, hogy az infertilitás háttérében 40%-ban nőgyógyászati, 40%-ban andrológiai tényezők állnak, míg 20%-ban az okok mindkét félben kereshetők (Huynh és mtsai, 2002; ESHRE Capri Workshop Group, 2004).

A férfi infertilitás okai lehetnek pretesztikuláris, tesztikuláris diszfunkcióval összefüggő és poszttesztikuláris eredetűek. A pretesztikuláris okok közé a hipogonadizmus és a közösülési problémák tartoznak. A tesztikuláris diszfunkció lehet veleszületett, szerzett vagy idiopátiás. A veleszületett okok közé soroljuk az anorchiát, cryptorhidizmust, vas deferens hiányt és egyéb genetikai eltéréseket. Szerzett eltérések a tesztisz trauma, az orchitis, az epididimitis, a prostatitis, a prostatovasculitis, a varicokele illetve számos antispermatogén ágens (kemoterápia, irradiáció, hő) hatására bekövetkező változások. A poszttesztikuláris okok között a sérüléseket, a fertőzéseket, a gyulladásokat és az autoimmun infertilitást kell megemlítenünk. A női infertilitás okai funkcionális vagy organikus eredetűek lehetnek. A funkcionális okokhoz tartoznak az endokrin működés, vagy a peteérés zavarai, az organikus okok közé a reprodukcióban részt vevő szervek egyéb betegségei, mint a petevezeték-elzáródás és a méhfejlődési rendellenességek (Klinikai Genetikai Szakmai Kollégium, 2006).

A fejlett országokban az infertilitás gyakorisága 10-15%-ra tehető, hét európai párból egy reprodukciós nehézségekkel küzd, míg az ismétlődő vetélések gyakorisága 0,5-3% között változik a reprodukzív életkorban lévő házaspárok esetén (Foresta és mtsai, 2002; Krausz, 2011). A Központi Statisztikai Hivatal adatai szerint hazánkban 100-150 ezerre becsülhető a meddő párok száma, amely az elmúlt években rohamosan nő. E növekedésben szerepet játszik az a tény, hogy míg régebben a párok elfogadták a gyermektelenség tényét, mára a társadalmi nyitottság miatt egyre gyakrabban fordulnak orvoshoz. Ettől függetlenül megállapítható, hogy az infertilitás abszolút gyakorisága nő. Ennek hátterében számos tényező állhat, így a férfiak csökkenő spermium koncentrációja, számos környezeti ártalom, epigenetikai tényezők stb., de nem hagyhatjuk figyelmen kívül a pszichés okokat sem.

2.2. A férfi nemzőképtelenség genetikai okai

Az infertilis férfiak vizsgálata az andrológiai vizsgálattal (sperma analízissel) kezdődik. Anatómiai és fiziológiai okok hiányában felmerül a genetikai eredet lehetősége. Az esetek felében várható genetikai eltérés, de csak mintegy 15%-ban sikerül azt diagnosztizálni. Számos tényező ismeretlen és ritka, s a genetikai eltérések mellett epigenetikai eredetű változásokra is számítani lehet. A genetikai rendellenességek lehetnek kromoszómális, Mendeli öröklődésű (monogén) és multifaktoriális eredetűek (Foresta és mtsai, 2002; Ferlin és mtsai, 2006; Krausz, 2011; Jungwirth és mtsai, 2012). A férfi infertilitás hátterében álló leggyakoribb genetikai tényezőket az **1. táblázatban** foglaljuk össze.

Kromoszóma-eltérések

Nemi kromoszóma eltérések

- 45,X
- 46,XX
- 47,XXY; 48,XXXY; stb.
- 47,XYY; 48,XXYY; stb.
- Szerkezeti Y kromoszóma-eltérések
- Mozaikosság

Autoszóma eltérések

- Robertson-transzlokáció
- Reciprok-transzlokáció
- Inverzió
- Egyéb szerkezeti eltérések

Génmutációk

Y kromoszóma

- Yq11 mikrodeléciók (AZF régió)

X kromoszóma

- Kallmann szindróma (*KAL1*)
- Androgén inszenzitivitas szindróma (*AR*)

Autoszómális génmutációk

- *CFTR* mutációk
- Mendeli módon öröklődő anyagcsere betegségek
- Gonadotropin-receptorok mutációi

1. táblázat. A férfi infertilitás fontosabb genetikai okai.

2.2.1. Kromoszóma eltérések

A kromoszóma-eltérések incidenciája 1:100, fele számbeli, fele szerkezeti eltérés, de előfordulhat a számbeli és szerkezeti eltérések együttes jelenléte is (Jackson, 2002; Silber és Repping, 2002). Mind a számbeli, mind a szerkezeti kromoszóma eltérések gyakrabban fordulnak elő infertilis férfiakban, mint az átlag populációban. Az andrológiai eredetű meddőség hátterében az esetek mintegy 5%-ában áll kromoszómális ok, amely azozoospermia esetén 15%-ra emelkedik (Foresta és mtsai, 2002; Vicdan és mtsai, 2004; Nagvenkar és mtsai, 2005; Krausz, 2011; Jungwirth és mtsai, 2012).

A nemi kromoszóma rendellenességek a kromoszóma eltérések 80%-át teszik ki (Hargreave, 2000; Visootsak és mtsai, 2001; Huynh és mtsai, 2002), nagy részük számbeli kromoszóma aberráció (Klinefelter szindróma és variációi, számfeletti Y kromoszóma) (Powell, 1999). Kevesebb a szerkezeti rendellenesség, ezek többsége az Y kromoszóma makroszkópos szerkezeti elváltozása. Előfordul még az Y kromoszóma rövid karjának az X kromoszómára, vagy autoszómákra történő transzlokációja, amikor a 46,XX kariotípus

ellenére férfi fenotípus alakul ki. Ez 90%-ban a nemet meghatározó SRY (sex determination region) gén jelenlétével magyarázható. A férfi infertilitás hátterében legtöbbször Klinefelter szindróma, vagy a nemi kromoszómák egyéb szám-, vagy szerkezetbeli eltérése áll (3,7%) (Krausz, 2011; Jungwirth és mtsai, 2012).

Az autoszómák kiegyensúlyozott reciprok és Robertson transzlokációja szintén infertilitáshoz vezethet. A reciprok transzlokáció infertilis populációban való előfordulási gyakorisága 0,7-1,2%, míg a normál populációban 0,09%. A transzlokáció különböző kromoszóma részek kicserélődésével jön létre. A transzlokáció általában fenotípusos elváltozást nem okoz, de ismétlődő magzati vetélésekhez vezethet a kiegyensúlyozatlan transzlokációt hordozó spermiumok számának (20-80%) gyakorisága miatt. A Robertson transzlokáció két akrocentrikus kromoszóma fúziójával jön létre, amikor a rövid karok elvesztése mellett létrejövő dicentrikus kromoszóma a két hosszú karból áll. Az elváltozás a meiózis folyamatának zavara révén károsíthatja a spermatogenezist. A Robertson transzlokáció előfordulási gyakorisága a populációban 0,1%, infertilis férfiak között jóval gyakoribb, 0,9% körüli (Foresta és mtsai, 2002; Ferlin és mtsai, 2006).

2.2.2. Az Y kromoszóma hosszú karjának deléciói

A genetikai okok között a férfi infertilitásért a Klinefelter-szindróma után leggyakrabban az Y kromoszóma hosszú karjának mikrodeléciói okozta csökkent spermiumszám tehető felelőssé (Simoni és mtsai, 2004; Jungwirth és mtsai, 2012). Irodalmi adatok szerint az azoospermiás férfiaknál gyakoribbak az Y kromoszóma mikrodeléciói, mint oligozoospermia esetén, gyakoriságuk a 15%-ot is elérheti (Krausz és mtsai, 2001). Az Y kromoszóma AZF (azoospermia faktor) régiója felelős a spermatogenezisért, mely három alrégióra osztható: AZFa, AZFb és AZFc (Vogt és mtsai, 1996). E régiók különböző mikrodeléciói eltérő variációkat eredményeznek: leggyakoribb az AZFc deléció (az összes

eset 79%-a), melyet gyakoriságban az AZFb (9%), AZFb+c (6%), AZFa (3%) és AZFa+b+c (46,XX kariotípusú férfiak, 3%) régió deléciója követ (Simoni és mtsai, 2004).

Az AZF régió amplikonokba szerveződött repetitív szekvenciákból épül fel, melyek párosával és ellentétes orientációban palindromokat alkotnak (Skaletsky és mtsai, 2003). Ez a szerveződés kedvez - homológ rekombináció révén - a deléciók és átrendeződések kialakulásának (Repping és mtsai, 2003). A régió 60 fehérjét kódoló génje közül 27 herében expresszálandó fehérjét kódol. A deléciók során elvesztett gének funkciókiesése károsítja a spermatogenezist (Simoni és mtsai, 2004).

Az AZFa régió 1,1 Mb nagyságú és egy kópiában tartalmazza az *USP9Y* és a *DBY* géneket (Blanco és mtsai, 2000). Az AZFb és az AZFc régió 24 génből áll, ezek legtöbbszörös kópiában van jelen. Az AZFb régió deléciója 6,2 Mb nagyságú, míg az infertilis férfiakra legjellemzőbb AZFc deléciója 3,5 Mb elvesztésével jár. Az AZFb és AZFc régió együttes deléciója a rekombinációtól függően 7,7 Mb vagy 7 Mb nagyságú DNS szakaszt érint (Repping és mtsai, 2002).

Az AZFa régió deléciója komplett Sertoli Cell Only (SCO) szindrómával és azoospermiával jár. Ilyen delécióval rendelkező férfiak heréjéből nem nyerhető spermium intracitoplazmatikus spermium injektáláshoz (ICSI). AZFb és AZFb+c deléció szintén okozhat SCO szindrómát, vagy más spermiumképződési zavar révén azoospermiát. Néhány tanulmány szerint ezekben az esetekben sem nyerhető spermium a hereszövetből a tesztikuláris spermium extrakció (TESE) során (Krausz és mtsai, 2000; Hopps és mtsai, 2003). Tehát az AZFa, AZFb és AZFb+c deléció esetén még az ICSI sem lehetséges. Az AZFc régió deléciója változatos klinikai és szövettani fenotípussal járhat. Ilyen típusú deléció azoospermiás és oligozoospermiás férfiakra jellemző. AZFc deléciós férfiak hereszövetéből TESE-vel nyerhető ICSI-re alkalmas spermium (Luetjens és mtsai, 2002; Oates és mtsai, 2002). Az illető férfi fiúgyermeké AZFc deléció hordozó lesz.

Az Y kromoszóma szerkezetét és a deléció mechanizmusát figyelembe véve parciális mikrodeléciók is előfordulhatnak az AZFb és az AZFc régiókban. A részleges deléciók előfordulása és patológiai jelentősége még nem teljesen tisztázott. A gr/gr típusú deléciók esetében összefüggést találtak a spermiumképzés zavarával (Repping és mtsai, 2003). A gr/gr parciális deléciók során az AZFc gének fele elvész, beleértve a legfontosabb AZFc gén, a *DAZ* (deleted in azoospermia) gén két kópiáját is. A gr/gr deléció mellett a leggyakoribb a b2/b3 és a b1/b3 típusú parciális deléció, melyek fertilitásban játszott szerepe nem jelentős (Giachini és mtsai, 2005). Az Y kromoszóma és az AZFc régió szerkezetét az **1. ábra** mutatja.

2.2.3. Az SRY gén

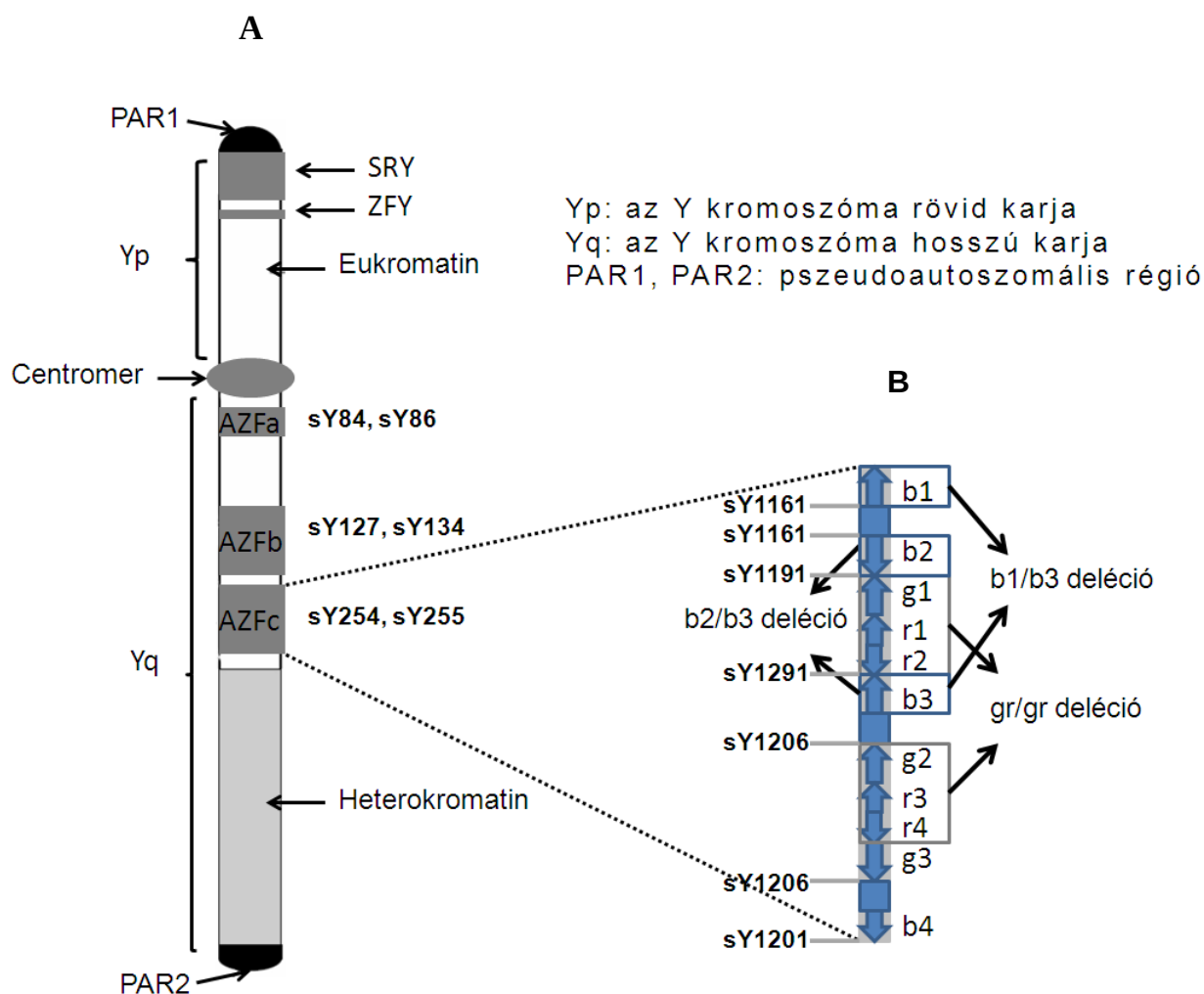
Az Y kromoszóma azoospermia faktor gének kiesése mellett figyelmet érdemel az *SRY* gén, amely az Y kromoszóma rövid karjának proximális részén található (Mizuno és mtsai, 2005). Az *SRY* gén egy transzkripciósfaktort kódol, amely számos gén szabályozásában vesz részt (Strachan és Read, 2004). Az *SRY* gén az Y kromoszómáról az X kromoszómára transzlokálódhat, 46,XX férfi szindrómát eredményezve. A szindróma prevalenciája 1:20000 (Maduro és Lamb, 2002). Ezek a férfiak fenotípusosan normálisak, heréjük kisebb, a herecsatornák hialinizálódtak, nincs spermium képzésük, az FSH szint emelkedett, a tesztoszteron szint csökkent (Zenteno-Ruiz és mtsai, 2001).

2.2.4. Génmutációk

2.2.4.1. Kallmann-szindróma

A Kallmann-szindróma anozmiával vagy hipozmiával társult hipogonadotróp hipogonadizmus (gonadotropin defektus), melynek incidenciája 1:60000. A szindróma hátterében a hipotalamusz GnRH szekréciójának deficienciáját az X kromoszómához kötött *KAL1* gén mutációi okozzák (Hargreave, 2000; Foresta és mtsai, 2002). A mutáns gén kóros anozmin molekulát kódol, így a GnRH neuronok normális szinapszis képzése elmarad

(Layman, 2002). A szindrómára a késői pubertás, magas termet, hipoplaziás here és pénisz, kriptorhizmus és a szaglás hiánya vagy csökkent volta jellemző.



1. ábra. Az Y kromoszóma (A) és az AZFc régió (B) szerkezete. Az Y kromoszóma hosszú karjának (Yq) AZFa, AZFb és AZFc régiói. Az AZFc régió amplikonjai részt vesznek a parciális mikrodélációk kialakulásában (gr/gr, b1/b3 és b2/b3 deléció). Az ábrán láthatók a vizsgált sequence tagged site (STS) –ok (sY84, sY86, sY127, sY134, sY254, sY255, sY1161, sY1191, sY1201, sY1206 és sY1291).

2.2.4.2. Az androgén inszenzitivitási szindróma

Az androgén inszenzitivitási szindrómának számos formája ismert, melynek enyhe formája (MAIS) szintén infertilitással társul. A betegség hátterében a célszövetek androgén, tesztoszteron és dihidrotesztoszteron hormonokra való csökkent érzékenysége áll, amelyért az

androgén receptor (AR) fehérje kóros működése tehető felelőssé (Krausz, 2011). Az AR gén az X kromoszóma hosszú karján található, transzaktiváló, DNS- és szteroid-kötő doménekkel rendelkezik. A gén két polimorf trinukleotid mikroszatellitát tartalmaz a transzaktiváló domén kódolásáért felelős 1. exonjában. Az első mikroszatellita, a poliglutamin szakasz (CAG), 8-60 közötti ismétlődésből állhat, míg a második poliglicin (GGC) ismétlődés 4-31 között változhat. A poliglutamin szakasz hosszával különböző kórképek hozhatók összefüggésbe. A prosztata rákra, a hepatocelluláris karcinómára és a mentális retardációra a szakasz extrém rövidege, míg a spinális és bulbáris muszkuláris atrófiára (SBMA) a CAG repeat 40 fölötti ismétlődési száma jellemző. A poliglutamin szakasz növekedését összefüggésbe hozzák a férfi infertilitás, a nem megfelelő maszkulinizáció kialakulásával (MAIS) (Jääskeläinen, 2012).

2.2.4.3. Cisztás fibrózis

A cisztás fibrózis az egyik leggyakoribb autoszomális recesszív öröklésmenetű kórkép, előfordulási gyakorisága 1:2500 (Lewis-Jones és mtsai, 2000). A betegség hátterében a sejtmembrán klorid csatornáit szabályozó CFTR fehérje működésképtelensége áll, a besűrösödött nyák elzárja a külső elválasztású mirigyek kivezetőcsöveit. *Kongenitális bilaterális vas deferens hiányban* (congenital bilateral absence of vas deferens, CBAVD) szenvedő férfiben mindkét vas deferens hiányzik, vagy átjárhatatlan a spermiumok számára, azoospermiát okozva, *kongenitális unilaterális vas deferens hiány* (congenital unilateral absence of vas deferens, CUAVD) esetén egy vas deferens van és súlyos oligozoospermiát okoz (spermiumszám $<5 \times 10^6/\text{ml}$) (Foresta és mtsai, 2002; Maduro és Lamb, 2002). Magyarországon a Δ -F508 mutáció mintegy 60%-ban áll a cisztás fibrózis hátterében. További gyakori mutációk az R117H, a 218delA, és a 1148T mutációk, de kettős (compaund) heterozigóták is előfordulnak. Az 5/7/9T polimorfizmus a CBAVD-re jellemző (Németh és mtsai, 1996).

2.2.4.4. A gonadotróp hormonokat kódoló gének mutációi

A *GnRH receptor* mutációi hipogonadotróp hipogonadizmushoz vezetnek, míg a *gonadotropin (LH, FSH) gének* mutációi alacsonyabb ösztrodiol szintet, hipogonadizmust, csökkent spermiumképzési képességet eredményeznek. Az *LH* mutációi súlyosabb fenotípusos következményekkel járnak, mint az *FSH* mutációi, mivel az *LH* a herék tesztoszterontermelő képességét szabályozza, míg az *FSH* a spermiumtermelést kontrollálja (Foresta és mtsai, 2002; Krausz, 2011).

2.2.5. A spermiumok genetikai eltérései

2.2.5.1. A spermiumok aneuploidája

A spermiumsejtek nagyobb gyakorisággal tartalmazzak genetikai eltéréseket: kromoszóma aberrációkat, génmutációkat, mint a szomatikus sejtek (Foresta és mtsai, 2002). Ugyanakkor a spermiumok tanulmányozása egyrészt sokkal nehezebb, másrészt vizsgálatukkal csak az adott minta genetikai eltéréseiről kaphatunk információt. Leggyakrabban a spermiumok aneuploidiait és diploidiait vizsgálták (Downie és mtsai, 1997; Egozcue és mtsai, 1997; Jakab és mtsai, 2003). Az éretlen spermiumok aránya és a kromoszóma diszómia gyakorisága összefüggésben áll egymással, mivel a diszómia főleg az éretlen spermiumokra jellemző (Kovanci és mtsai, 2001). Az éretlen spermiumok aránya csökken, ha a spermium koncentráció nő (Kovanci és mtsai, 2001; Celik-Ozenci és mtsai, 2004). Normál kariotípusú, de infertilis férfiak csökkent spermiumkoncentrációval és/vagy morfológiailag kóros spermiumok nagy számával bíró férfiak nagyobb eséllyel termelnek aneuploid kromoszóma készletű spermatozoákat, főleg a nemi kromoszómák tekintetében (Shi és Martin, 2001). A fluorescens in situ hibridizáció (FISH) alkalmas nagyszámú spermium számbeli kromoszóma aberrációjának meghatározására. A legegyszerűbb módszer a spermium minták becsült számbeli kromoszóma aberrációinak meghatározására az úgynevezett konzervatív módszer, melynek során egy autoszóma és a két nemi kromoszóma

fluorescens jelölésével határozzuk meg számbeli eltérésük gyakoriságát (Downie és mtsai, 1997; Egozcue és mtsai, 1997; Jakab és mtsai, 2003).

2.2.5.2. A spermiumok hialuronsav kötő képessége

A spermiumsejtek citoplazmájának spermatogenezisben való átalakulása során a plazma membrán hialuronsav (HA) kötő helyei is kialakulnak, melyek a zona pellucidához való kötődésben játszanak szerepet (Huszar és mtsai, 1997; 2003). A HA kötés a HA receptorok jelenlététől függ, mely összefüggésben van a sejtek érettségével (Huszar és Vigue, 1993). A HA-hoz kötött, ill. kötődni képes spermium életképes és intakt DNS-el rendelkezik (Huszar és mtsai, 2007; Yagci és mtsai, 2010). Számos tanulmány talált összefüggést a csökkent spermium érettség, a magas kromoszóma aneuploidia, az apoptózis és a fragmentált DNS állomány között (Huszar és Vigue, 1993; Huszar és mtsai, 2000; 2003, 2007; Yagci és mtsai, 2010). A HA kötődésen alapuló spermiumszelekciós módszerek jelentősen csökkentik a kromoszóma aberrációk gyakoriságát (Jakab és mtsai, 2005). Ez különösen fontos az ICSI eljárás során, mivel az infertilis férfiak spermiumsejtjei fragmentált DNS-t és kromoszóma aberrációkat tartalmazhatnak (Celik-Ozenci és mtsai, 2004; Huszar és mtsai, 2007).

2.2.5.3. Non-diszjunkció – kromoszómák szegregációja okozta kiegyensúlyozatlan kromoszóma készlet

A kiegyensúlyozott transzlokációt hordozó férfiak rendszerint nem mutatnak klinikai tünetet, de a spermatogenezis során fellépő non-diszjunkció következtében a spermiumsejtek jelentős hányada kiegyensúlyozatlan formában tartalmazza az érintett kromoszómákat. Ez leggyakrabban ismétlődő vetéléseket okozva vezet infertilitáshoz (Morel és mtsai, 2004; Perrin és mtsai, 2010).

Kiegyensúlyozott reciprok transzlokáció hordozó esetén az első meiotikus osztódás során quadrivalens képződik a transzlokált kromoszómák és a normál homológok között a spermatocita pachytén állapotában, öt eltérő szegregációs utat eredményezve. Kizárólag az

alternáló szegregációs mód vezet kromoszómálisan normális és kiegyensúlyozott gaméták keletkezéséhez. A további négy szegregációs mód (adjacent I, adjacent II, 3:1 és 4:0) kromoszómálisan kiegyensúlyozatlan spermiumsejteket eredményez (Egozcue és mtsai, 2000; Morel és mtsai, 2004; Perrin és mtsai, 2010). Mindezek mellett a strukturális átrendeződés interkromoszomális hatás (ICE) révén olyan kóros megoszlású bivalenseket eredményezhet, melyek nem érintettek a reciprok transzlokációban, és amelyek non-diszjunkcióhoz és aneuploid spermatozoához vezethetnek (Blanco és mtsai, 2000; Estop és mtsai, 2000; Gianaroli és mtsai, 2002).

Az 1980-as évekig heterospecifikus fekvendőség segítségével tanulmányozták a meiotikus szegregációt aranyhőrcsög petesejtet humán spermatozoával termékenyítve meg (Morel és mtsai, 2004; Perrin és mtsai, 2010). A FISH bevezetésével lehetővé vált a spermiumsejtek kromoszóma állományának tanulmányozása (Downie és mtsai, 1997; Egozcue és mtsai, 1997; Escudero és mtsai, 2003).

2.3. A női infertilitás leggyakoribb genetikai okai

A molekuláris biológia fejlődésének köszönhetően számos tanulmány született, mely a női infertilitás hátterében álló genetikai okokat tisztázza. A kromoszóma aberrációk mellett számos gén mutációja vezethet infertilitáshoz, többek között a hipotalamusz-hipofízis-petefészek tengely hormontermeléséért felelős gének defektusai, a szteroid bioszintézis zavarai, valamint a szteroid hormonokra való érzéketlenség, melyeket szintén gyakran génmutációk okoznak (Foresta és mtsai, 2002; Laml és mtsai, 2002; ESHRE Capri Workshop Group, 2004; Shelling és mtsai, 2010). Az asszisztált reprodukciós eljárások során hormonkezelésre rosszul reagálók esetében is felmerül a genetikai tényező szerepe (Foresta, 2002). A kromoszóma eltérés nélküli nők igen magas arányban (több mint 20%) képeznek kromoszómálisan kóros oocitákat. Előrehaladott anyai életkor esetén az oocitákat érintő genetikai eltérések gyakorisága nő, ezért asszisztált reprodukció előtt ajánlott a genetikai

tanácsadás (Foresta és mtsai, 2002; ESHRE Capri Workshop Group, 2004; Klinikai Genetikai Szakmai Kollégium, 2006). A női infertilitás hátterében álló leggyakoribb genetikai tényezőket a **2. táblázat** foglalja össze.

Kromoszóma-eltérések	Génmutációk
Nemi kromoszóma eltérések • 45,X • 46,XY • 47,XXX; 48,XXXX; stb. • i(Xq); del(Xq); del(Xp); r(X); stb. • X-autoszóma transzlokációk • Mozaikosság Autoszóma eltérések • Robertson-transzlokáció • Reciprok-transzlokáció • Inverzió • Egyéb szerkezeti eltérések	X kromoszóma • Fragilis X szindróma (<i>FMR1</i>) • Kallmann szindróma (<i>KAL1</i>) • Komplet androgén inszenzitivitási szindróma (<i>AR</i>) Autoszómák • Mendeli módon öröklődő anyagcsere betegségek • Gonadotropin-receptorok genetikai defektusai • GnRH receptor genetikai defektusa

2. táblázat. A női infertilitás fontosabb genetikai okai.

2.3.1. Kromoszóma eltérések

A női infertilitásban leggyakrabban előforduló kromoszóma eltérés a Turner-szindróma, de számos autoszómát érintő strukturális kromoszóma aberráció is okozhat meddőséget. A nőket érintő kromoszóma aberrációk gyakorisága infertilitásban 5%, ebből 2,8% számbeli nemi kromoszóma eltérés míg 2,1% autoszómát érintő strukturális abnormalitás. Nemi kromoszóma eltérést hordozó nők fenotípusa nagyon variábilis, jellemző a primer ovárium diszfunkció (hipergonadotropizmus) primer és szekunder amenorrhoeával vagy oligomenorrhoeával. A Turner-szindróma előfordulási aránya a primer amenorrhoeások között 30%-ra tehető. Az autoszomális strukturális abnormalitások (elsősorban kiegyensúlyozott transzlokációk) ismételt vetéléseket eredményeznek. Ugyanakkor nőkben bizonyos kromoszóma aberrációk (például 47,XXX) nem feltétlenül járnak infertilitással

(Foresta és mtsai, 2002; ESHRE Capri Workshop Group, 2004; Klinikai Genetikai Szakmai Kollégium, 2006).

2.3.2. Génmutációk

A fragilis X szindróma fiúk mentális retardációjának leggyakoribb oka, melyet az *FMR1* gén 1. exonjában lévő CGG trinukleotid repeatek expanziója okoz. Az *FMR1* génben a CGG repeatek száma normális esetben 6-45 között van. Ha az ismétlődési szám 54-200 közöttre nő és az allél nem metilált, premutációról beszélünk, míg 200 fölötti repeat szám esetén alakul ki a mentális retardációval járó szindróma. A korai petefészek elégtelenség (premature ovarian failure, POF) sporadikus előfordulása esetén 1,6%, míg familiáris halmozódásnál 16%-ban várható az *FMR1* gén premutációja. Az *FMR1* premutációt hordozó nők 15-25%-a korai ovárium elégtelenségben szenved (Tassone és mtsai, 2008; Filipovic-Sadic és mtsai, 2010). A POF jellemző tünetei az oligomenorrhoea és a magas gonadotropin szint (Shelling és mtsai, 2010). A premutációt hordozók az asszisztált reprodukciós eljárások során a hormonkezelésre rosszul reagálnak (Foresta és mtsai, 2002; Laml és mtsai, 2002).

A Kallmann-szindróma, melyet a *KAL1* gén mutációi okoznak, nagyon ritka esetben okoz infertilitást nőkben primer amenorrhoeával, hypergonadotropinizmussal és anosmiával. A szindróma gyakran uterus malformációkkal is társul. A heterozigóta mutációhordozók nem mutatnak tüneteket (Hargreave, 2000; Foresta és mtsai, 2002).

Az androgén receptor gén mutációi 46, XY kariotípus mellett komplett androgén inszenzitívitási szindrómát okozhatnak normál női külső genitáliákkal, azonban ebben a betegcsoportban az infertilitás csak a tünetek velejárója (Jääskeläinen, 2012). Vannak azonban olyan betegségek, amelyekben az infertilitás vezető tünet: az *FSH*, az *LH* és a *GnRH* receptor gének valamint az *FSH* gén mutációi (Foresta és mtsai, 2002).

2.4. Célkitűzések

Kísérletes munkám célja az infertilitás hátterében álló genetikai eltérések vizsgálata és a hazai betegek körében végzett vizsgálati eredmények összehasonlítása a nemzetközi irodalmi adatokkal. E cél megvalósításához az alábbi vizsgálatokat végeztem:

- Infertilis férfiak és nők citogenetikai vizsgálatával az infertilitáshoz vezető kiegyensúlyozott kromoszóma eltérések vizsgálata és azok gyakoriságának összevetése a nemzetközi adatokkal.
- Csökkent spermiumszámú férfiakban az Y kromoszóma AZF régiójában fellépő mikrodeléciók és kópiaszám variációk (parciális mikrodeléciók) vizsgálata. A talált deléciók előfordulási gyakoriságának összehasonlítása normál spermium paraméterekkel rendelkező és bizonyítottan fertilis (legalább egy gyermekkel rendelkező férfiak) férfiakból álló kontroll csoportok adataival és az irodalmi adatokkal.
- Csökkent számú és/vagy kóros mozgású spermiummal bíró infertilis férfiak spermiumainak vizsgálata egy jellemző biokémiai markerrel, a hialuronsav kötő képesség meghatározásával. Ugyanazon férfiak spermiumaiban kromoszóma aberrációk vizsgálata FISH módszerrel. A talált eltérések összehasonlítása a különböző kóros és normális spermium paraméterekkel bíró egyéneknél. Összefüggés tanulmányozása a spermiumszám, a spermiumok mozgási képessége, hialuronsav kötő képessége és a spermiumsejtek kromoszóma aberrációinak gyakorisága között.
- Kiegyensúlyozott transzlokáció hordozó infertilis férfi meiotikus szegregációjának tanulmányozásával a szegregációs mintázat meghatározása és az eredmények összevetése az irodalmi adatokkal. Továbbá a transzlokációban érintett kromoszómák interkromoszomális hatásának vizsgálata és az eredmények kontroll csoporttal való összehasonlítása.

- Korai ovárium elégtelenségben szenvedő nők *FMR1* génjében jelenlévő CGG triplet expansziójának vizsgálata. Az eltérés gyakoriságának megállapítása és nemzetközi adatokkal történő összevetése.
- Végül célom a genetikai vizsgálatok eredményének megismertetése a meddőség kivizsgálásában hazánkban ma közreműködő szakemberekkel. A szülész-nőgyógyász, andrológus és az IVF-ban közreműködő kollégák figyelmének felhívása a genetikai vizsgálatok elvégzésének szükségességére IVF-t megelőzően.

3. BETEGEK ÉS MÓDSZEREK

3.1. A vizsgálatban résztvevők

3.1.1. A vizsgált infertilis férfiak és nők

2007 január 1. és 2012 március 31. között 500 esetben (305 férfi és 195 nő) került sor citogenetikai vizsgálatra organikus és endokrinológiai okok kizárását követően. Százötven idiopátiás - klinikai eltérés nélküli és normális kariotípusú - infertilis férfi Y kromoszóma mikrodeléció és parciális mikrodeléció vizsgálatát végeztük. Közülük a 64 azoospermiás (az ejakulátum nem tartalmazott spermiumsejteket) és a 86 nem obstruktív oligozoospermiás (átlagos spermiumkoncentráció: $4,8 \times 10^6/\text{ml}$; $0,1-14 \times 10^6/\text{ml}$) infertilis férfi spermium mintáit WHO kritériumok szerint osztályoztuk (WHO, 2010).

A spermium sejtek vizsgálata során 28 infertilis, normális kariotípusú férfi spermium mintáinak kromoszóma aberráció gyakoriságát és hialuronsav kötődési képességét tanulmányoztuk. A sperma vizsgálat eredményét a WHO 2010-es referencia értékei alapján értékeltük. A spermium koncentráció és motilitás alapján a vizsgált betegeket három csoportba osztottuk: oligozoospermiás, asthenozoospermiás és oligoasthenozoospermiás betegek csoportjába. Az oligozoospermiás csoportba tartozó tíz férfi spermium koncentrációja $15 \times 10^6/\text{ml}$ alatt (range: 1-15), a progresszívan mozgó sejtek aránya 32% fölött volt (range: 35-80). A kilenc asthenozoospermiás férfi spermium koncentrációja a normál tartományba esett (range: 18-58), de a progresszíven mozgó sejtek aránya 32% alatt maradt (range: 5-30). Az oligoasthenozoospermiás csoport (n=9) alacsony spermium koncentrációjú (range: 4-12) és rossz mozgású sejteket produkáló (range: 0-32) férfiakkól állt.

A szegregációs tanulmányban egy t(3;6)(q21;q23) kiegyensúlyozott transzlokációt hordozó férfi spermiumainak FISH vizsgálatát végeztük. A beteg feleségénél a kivizsgálást megelőzően négy év alatt négy spontán abortusz történt. Az abortuszokra hét és kilenc

terhességi hét körül került sor. A beteg spermium koncentrációja $81 \times 10^6/\text{ml}$ volt, 60 %-ban normálisan mozgó sejtekkel.

Az *FMR1* gén vizsgálatára 17 korai ovárium elégtelenségben szenvedő, normális kariotípusú nő esetében került sor. A gén triplet expanziója vizsgálatának szükségessége az endokrinológiai eltérések (oligomenorrhoea és magas gonadotropin szint), valamint az asszisztált reprodukció során az ovárium stimulációra adott elégtelen válasz alapján merült fel.

A betegek a Debreceni Egyetem Orvos- és Egészségtudományi Centrum (DE OEC) Szülészeti és Nőgyógyászati Klinika Meddőségi/Endokrinológiai Szakrendeléséről, a DE OEC Urológiai Klinika Andrológiai Szakrendeléséről, a DE OEC Gyermekgyógyászati Intézet, Klinikai Genetikai Központ járóbeteg szakrendeléséről, valamint a Kaáli Intézetből érkeztek.

Minden beteg csoport esetében írásban adott beleegyező nyilatkozattal, illetve etikai engedéllyel (2976/2012-EHR) rendelkezünk.

3.1.2. Kontroll csoportok

Száztíz normozoospermiás férfi (átlagos spermiumkoncentráció: $46,2 \times 10^6/\text{ml}$, range: 18-114) és 22 bizonyítottan fertilis férfi (legalább egy egészséges gyermekük született) szolgált kontrollként a parciális mikrodeléziós vizsgálat során.

A spermiumok kromoszóma aberráció gyakoriságának és hialuronsav kötődési képességének meghatározásához 17 normozoospermiás spermium donor (átlagos spermiumkoncentráció: $85,8 \times 10^6/\text{ml}$, range: 40-160) szolgált kontrollként.

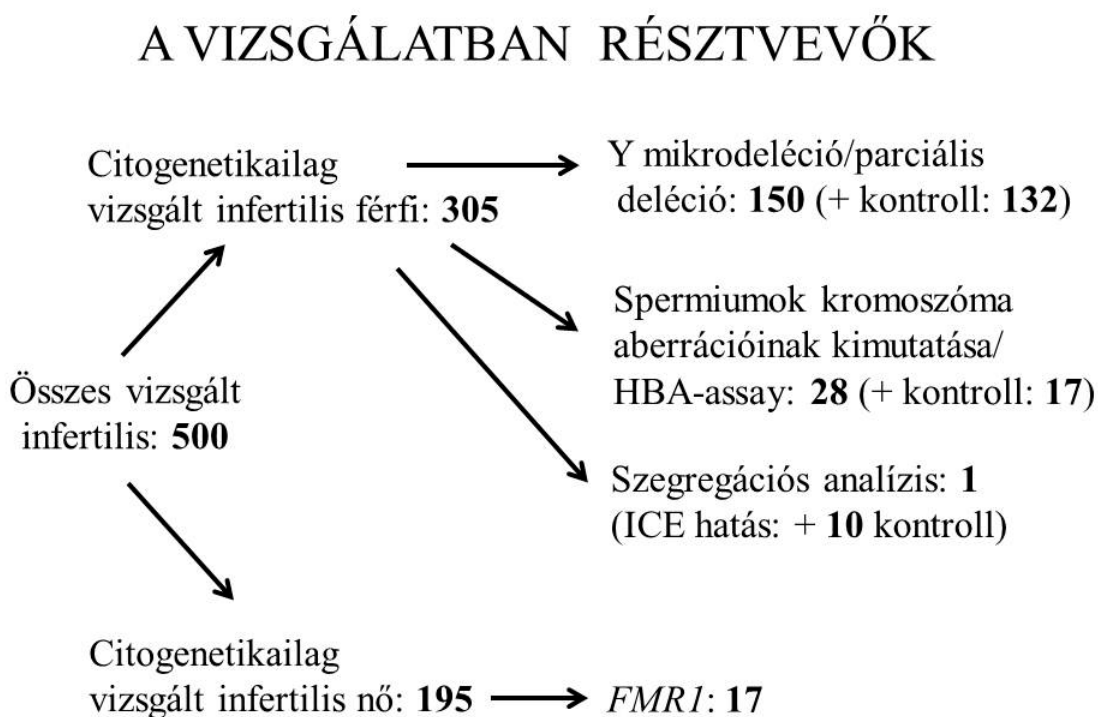
A szegregációs tanulmányban az interkromoszomális hatás tanulmányozásához egyrészt öt normozoospermiás férfi (1. csoport: átlagos spermiumkoncentráció: $95,3 \times 10^6/\text{ml}$, range: 41-160; és 60% fölötti normál motilitású sejtek, range: 60-95), és másik öt oligozoospermiás, normális kariotípusú férfi (2. csoport: átlagos spermiumkoncentráció: $6,4 \times 10^6/\text{ml}$, range: 3-

15; és 60% fölötti normál motilitású sejtek, range: 60-85) szolgált kontrollként. A két kontroll csoportban a normális morfológiájú spermium sejtek aránya 30% fölött volt.

Minden kontroll csoport sperma analízise WHO kritériumok szerint történt (WHO, 2010). A kontroll csoportok mintái a DE OEC Urológiai Klinika Andrológiai Szakrendeléséről, a DE OEC Gyermekgyógyászati Intézet, Klinikai Genetikai Központ járóbeteg szakrendeléséről és a Kaáli Intézetből érkeztek.

Minden kontroll csoport esetében írásban adott beleegyező nyilatkozattal, illetve etikai engedéllyel (2976/2012-EHR) rendelkezünk.

A vizsgálatban résztvevő betegek és kontroll csoportok megoszlását a **2. ábra** szemlélteti.



2. ábra. A vizsgálatban résztvevő betegek és kontroll csoportok megoszlása.

3.2. Vizsgálati módszerek

3.2.1. Citogenetikai és FISH vizsgálat

A betegek konstitúcionális kariotípusát hagyományos citogenetikai analízissel határoztuk meg. A vizsgálathoz 3-5 ml Na-heparinnal alvadásgátolt vért használtunk. Minden tenyésztőedénybe 5 ml tenyésztőoldatot (fitohemagglutinin (PHA) tartalmú lymphochrome) és 0,5 ml alvadásgátolt vért mértünk. A tenyésztőedényt 72 órára 37 °C-os, CO₂ (5%) termosztátba helyeztük. A sejt kultúra metafázisban való leállítása colchicinnel, az interfázisú sejtmagok és metafázisú kromoszómák nyérése standard módszerrel (hipotonizálás: 0,075 M KCl és fixálás: metanol:ecetsav 3:1 arányú keveréke, Carnoy-fixáló) történt.

A Giemsa sávozás (G-sávozás) a leggyakrabban alkalmazott eljárás a rutin citogenetikai analízis során. A tárgylemezeket néhány másodpercre 0,005%-os tripszin oldatba helyeztük, majd 5 percig Giemsa festékekkel festettük. A Giemsa festék az AT-gazdag, későn replikálódó, többnyire inaktív géneket tartalmazó kromoszómarészekhez kötődik (sötét sáv). A GC-gazdag, korán replikálódó, aktív génekkel bíró kromoszómarészek világos sávként jelennek meg.

A metafázisok értékeléséhez Leica, Leitz Diaplan és Nikon mikroszkópokat és Lucia Cytogenetics System szoftvert használtunk. A betegek kariotípusának megadására az International System for Human Cytogenetic Nomenclature (ISCN) 2009-es nevezéktanának megfelelően került sor (Shaffer és mtsai, 2009).

A FISH vizsgálathoz a kromoszómapreparálás során nyert sejtszuspenziót használtuk. A vizsgálat metafázisú kromoszómákon és interfázisú sejteken egyaránt végezhető. A vérből nyert kromoszóma preparátumokon végzett FISH vizsgálatot a nemi kromoszómák számbeli mozaicizmusának kimutatására, a mozaicizmus mértékének meghatározására, az SRY gén meglétének igazolására, lokalizációjának meghatározására és transzlokációk kimutatására használtuk.

A FISH vizsgálat során a mitózisban blokkolt, hipotonizált, fixált sejteket tárgylemezre cseppentettük. Szárítás után a lemezeket 37°C-os 2 X SSC/0.5% NP-40 (Nonidet P-40 Substitute, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) oldatba helyeztük 15 percre, majd néhány perces pepszines (Pepsin lyophilized powder, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) emésztéssel az extracelluláris fehérjéket eltávolítottuk. A mosást követően a dehidráálás felszálló alkoholsorban történt. Száradást követően a próbákat felvittük a tárgylemezek előre megjelölt részeire. A vizsgálat során X (DXZ1, SpectrumOrange), Y (DYZ1, SpectrumGreen) centromera specifikus próbákat, SRY specifikus próbát (SpectrumOrange) (Abbott/Vysis, Des Plaines, IL, USA) és a szegregációs tanulmányhoz 3-as (CEP3, Red; Cytocell, Cambridge, UK) és 6-os kromoszóma centromera specifikus próbákat (CEP6, Spectrum Aqua; Kreatech Diagnostics, Durham, UK), valamint a 3-as kromoszóma hosszúkar végére specifikus szubtelomerikus próbát (3qter, Spectrum Green; Cytocell, Cambridge, UK) alkalmaztunk. A próbák és a minták denaturációja 76°C-on történt 3 percig, míg a hibridizációra 37°C-on egy éjszakán át hibridizációs készülékben (Hybrite, Abbott/Vysis, Des Plaines, IL, USA) került sor. A poszthibridizációs mosás 50% formamid/ 2X SSC oldatban történt 42 °C-on 15 percig. A lemezeket ezután 2X SSC oldatban 10 percig és 2X SSC/ 0,1 % NP-40 oldatban 5 percig szobahőn mostuk. A sejtmagokat 4'-6' diamino-2-fenil-indol (DAPI, Abbott/Vysis, Des Plaines, IL, USA) oldattal festettük.

A sejteket Zeiss Axioplan2 mikroszkópban (Carl Zeiss, Jena, Germany) ISIS szoftver (Metasystems, Althussheim, Germany) segítségével értékeltük.

3.2.2. DNS izolálás

Az Y kromoszóma molekuláris genetikai vizsgálataihoz és az *FMR1* gén fragment analíziséhez EDTA-val alvadásgátolt perifériás vérből DNS-t izoláltunk. A genomikus DNS izolálása QiaAmp DNA mini kit (Qiagen, Hilden, Germany) segítségével történt a gyártó által ajánlott protokollnak megfelelően.

3.2.3. Az Y kromoszóma AZF régiójának vizsgálata

Az Y mikrodeléciók vizsgálatát polimeráz láncreakcióval (PCR) végeztük az ajánlott protokoll szerint (Simoni és mtsai, 2004). Az AZF régió pontosan meghatározott szekvenciáit (sequence tagged site (STS)-ok) amplifikáltuk. A meghatározás mindhárom AZF régióra specifikus STS-primerekkel történt, egy-egy régióban külön PCR-ben két primerpárt alkalmaztunk (**1A. ábra**): AZFa régióra: sY84, sY86, AZFb régióra: sY127, sY134, AZFc régióra: sY254, sY255 (mindkettő a *DAZ* génben). Amplifikáció hiánya delécióra utalt. A parciális deléció megállapításához öt STS régiót vizsgáltunk (**1B. ábra**): gr/gr típusú delécióról beszélünk, ha az sY1291 deletálódott, az sY1161, sY1191, sY1201 és sY1206 jelen van, b2/b3 deléció esetén az sY1191 hiányzik, az sY1161, sY1201, sY1206 és sY1291 jelen van, illetve b1/b3 deléció esetén az sY1161, sY1191 és sY1291 deletálódott, az sY1201 és sY1206 amplifikálódott (Giachini és mtsai, 2005).

Az Y mikrodeléció kimutatásához kontroll PCR-eket alkalmaztunk: pozitív kontrollnak normál spermatogenezisű férfiak DNS mintáit, negatív kontrollnak női DNS mintákat használtunk. Vizes kontrollal a reagens kontaminációt ellenőriztük. Belső kontrollnak a *ZFX/ZFY* gént használtuk, mivel nőkben és férfiakban is megtalálható. Az Y kromoszóma meglétét a kromoszóma rövid karján lévő *SRY* gén vizsgálatával ellenőriztük. A parciális mikrodeléciók kimutatására az sY1191 és sY1291 site-ok multiplex amplifikációban, míg az összes többi szimplex PCR-ben került felsokszorozásra.

Az STS PCR reakciók paraméterei a következők voltak: 100ng DNS, 0,2 mM dNTP, 0,1 μ M minden primerből és 2 U DreamTaq DNS polimeráz 10X PCR pufferben. A PCR termékek Veriti thermal cycler (Applied Biosystem, Foster City, CA, USA) PCR készülékben amplifikálódtak. A PCR termékeket 2%-os agaróz gélen választottuk el.

A különböző spermiumkoncentrációjú férfiak között észlelt különbségek szignifikancia szintjét χ^2 -próbával fejeztük ki (SigmaStat szoftver, San Jose, CA, USA), $P=0,05$ szintet tekintve szignifikánsnak.

3.2.4. Spermiumok hialuronsav-kötő képességének vizsgálata

A FISH vizsgálathoz használt spermium minták hialuronsav kötő képességét vizsgáltuk 45: tíz oligozoospermiás, kilenc asthenozoospermiás, kilenc oligoasthenozoospermiás és 17 normozoospermiás kontroll férfi esetében. A spermium mintákat szobahőn (18-28°C) hagytuk elfolyósodni 30-60 percig. A mintákból szobahőn 7-10 μ l-t HBA-tesztre (MidAtlantic Diagnostics, Marlton, NJ, USA) pipettáztunk a tárgylemez közepére, melyre CELL-VU fedőlemezt tettünk, ügyelve a buborékmentes elhelyezésre. A lemezt 10 percig szobahőn hagytuk, mely szükséges a spermiumsejtek hialuronsavhoz való kötődéséhez. A hialuronsavhoz kötődött mozgó spermiumok arányát a következő képlet (HBA-teszt) segítségével számoltuk:

$$\text{Kötődési \%} = 100 \times \frac{\text{kötött mozgó spermiumsejtek száma}}{\text{összes mozgó spermiumszám}}$$

3.2.5. Spermiumok FISH vizsgálata

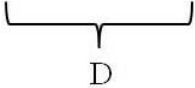
A spermaanalízis után a vizsgálat helyére 1 ml natív ondó került Eppendorf csőben. A spermium mintákból keneteket készítettünk, ezeket metanol és ecetsav 3:1 arányú keverékével 10 percig fixáltuk, majd etanol sorozatban dehidráltuk. A spermiumfej kompakt DNS-állományát először 10 mmol/l ditiotreitol (DTT, Sigma, St. Louis, MO, USA) + 0,1 mmol/l Tris-HCl (pH 8,0) oldattal, majd 10 mmol/l litium-dijódszalicilát (LIS, Sigma, St. Louis, MO, USA) + 0,1 mmol/l Tris-HCl oldattal dekonzenzáltuk. Az aneuploidia meghatározásához az irodalomban elfogadott ajánlás szerint három kromoszóma számbeli eltérést vizsgáltuk, a 17-es (D17Z1, SpectrumAqua), az X (DXZ1, SpectrumOrange) és az Y

kromoszóma (DYZ1, SpectrumGreen) (Abbott/Vysis, Des Plaines, IL, USA) centromerájához kötődő próbák segítségével (Downie és mtsai, 1997; Egozcue és mtsai, 1997). A szegregációs analízishez a perifériás vérben kimutatott kiegyensúlyozott transzlokációra specifikus FISH próbákat használtuk, a t(3;6)(q21;q23) hordozó férfi esetében a 3-as (CEP3, Red; Cytocell, Cambridge, UK) és 6-os (CEP6, Spectrum Aqua; Kreatech Diagnostics, Durham, UK) kromoszóma centromera specifikus és a 3-as kromoszóma hosszú karjának szubtelomerikus régiójához kötődő DNS próbát (3qter, Spectrum Green; Cytocell, Cambridge, UK) alkalmaztuk. A FISH vizsgálat a próbákat gyártó cég által javasolt protokoll szerint történik.

A spermiumok kromoszóma aberrációjának meghatározásához és az interkromoszomális hatás tanulmányozásához kenetenként 5000 sejtet elemeztünk. Az átlagos hibridizációs hatékonyság >98% volt. A sejtmagokat, amelyek egymással átfedtek, vagy nem volt hibridizációs szignáljuk, kihagytuk az értékelésből. A vizsgálat értékeléséhez Zeiss Axioplan2 (Carl Zeiss, Jena, Germany) fluorescens mikroszkópot és ISIS softvert (Metasystems, Althussheim, Germany) használtunk. Diszómának tekintettük a spermiumsejtet, ha három fluorescens jelet detektáltunk (valamelyik vizsgált kromoszómából többet tartalmaz a sejt), diploidnak, ha négyet (a két autoszóma szignál mellett látjuk a két nemi kromoszómát is).

Mivel az összes kromoszóma nagyszámú spermiumon való egyidejű vizsgálata rendkívül idő- és munkaigényes volna, elfogadott módszer a kumulatív aneuploidia becslése a nemi kromoszómák és legalább egy autoszómális kromoszóma diszómia frekvenciájának ismeretében (Downie és mtsai, 1997; Egozcue és mtsai, 1997). Azt feltételezve, hogy a nemi kromoszóma nulliszómia a diszómiával megegyező gyakorisággal fordul elő, valamint a 22 autoszóma aneuploidia frekvenciája egymással azonos, a minta becsült számbeli kromoszómaaberráció gyakoriságát a következőképpen számoltuk:

$$2A \times 22 + 2B + C = E$$



D

Ahol,

A: az ismert autoszomális diszómia frekvencia (17-es kromoszóma)

B: nemi kromoszóma diszómia frekvencia

C: diploidiagyakoriság

D: becsült kumulatív aneuploidia frekvencia

E: a minta becsült számbeli kromoszómaaberráció gyakorisága

A szegregációs mintázat tanulmányozásához 2000 spermium sejtet elemeztünk, ahol a szignálmintázat a meiotikus szegregációnak köszönhetően egyedi variabilitást mutat.

A vizsgált csoportok statisztikai analízise során a minta normalitását Shapiro-Wilk teszt, a minta homogenitását Barlett-teszt segítségével állapítottuk meg. Az átlagos spermium koncentráció, HA-kötő képesség, diszómia és diploidia gyakoriság, valamint a becsült számbeli kromoszóma aberráció gyakorisága közötti különbségek statisztikai analízise Mann-Whitney/Wilcoxon két mintás teszt és Kruskal-Wallis teszt (ha nincs normalitás), illetve két mintás t-próba (normalitás esetén) segítségével történt (SigmaStat és SPSS softver, San Jose, CA, USA). Az összefüggést a spermium koncentráció, HA-kötő képesség és a spermiumok becsült számbeli kromoszóma aberráció gyakorisága között Pearson- korrelációs teszt segítségével állapítottuk meg. A szegregációs analízis során az interkromoszomális hatás tanulmányozására a különbségek szignifikancia szintjét χ^2 -próbával fejeztük ki (Statistica szoftver, StatSoft, Tulsa, OK, USA). A statisztikai elemzés során $P < 0.05$ szintet tekintettük szignifikánsnak.

3.2.6. Az *FMR1* gén vizsgálata

Az *FMR1* gén 5' végén található CGG trinukleotid repeateket tartalmazó régiót polimeráz láncreakció (PCR) technikával amplifikáljuk az AmplidexTM *FMR1* PCR Kit (Asuragen, Austin, TX, USA) segítségével. A kit protokollja három lépésből áll: PCR,

kapilláris elektroforézis és a fragment méretének analízise. A PCR reakciók paraméterei a kit protokolljának megfelelően a következők voltak: 11,45 µl GC-Rich Amp Puffer, 0,5 µl *FMR1* F,R FAM-Primerek, 0,5 µl *FMR1* CGG Primer, 0,5 µl Diluent, 0,05 µl GC-Rich Polimeráz Mix és 2 µl DNS (a reakcióelegyben 20-40 ng). A PCR termékek Veriti thermal cyclers (Applied Biosystem, Foster City, CA, USA) PCR készülékben amplifikálódtak. A kapilláris elektroforézishez a reakciókat a következőképpen mértük össze: 11 µl Hi-Di formamid, 2 µl ROX 1000 Size Ladder és 2 µl denaturált PCR termék (95°C, 2 perc). A minta elválasztása 3500xL-Avant Genetic Analyzer készüléken POP-7 polimeren történt (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). A fragment analízis során kapott méretet GeneMapper 4.0/4.1 szoftver segítségével analizáltuk. A program két korrekciós faktor segítségével számítja ki a repeat számot a termékcsúcs méretéből mindkét allélon:

$$CGG_i = \frac{\text{Termékcsúcs}_i - c_0}{m_0}$$

CGG_i : repeat szám

c_0 : méret korrekciós faktor, 232,6

m_0 : mozgási korrekciós faktor, 2,962

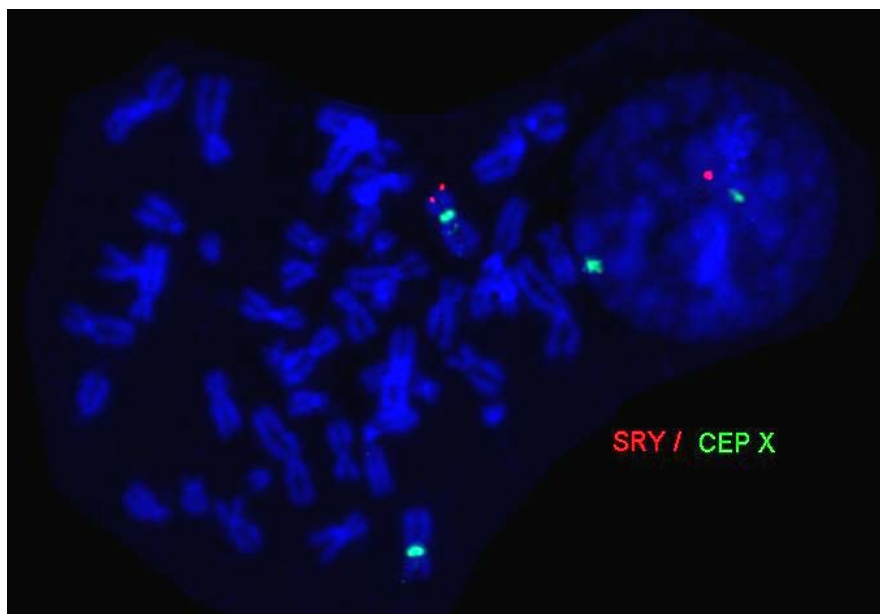
A detektálható repeat szám 5 és 200 közé esik, a módszerrel a mozaikos esetek is kimutathatók.

4. EREDMÉNYEK

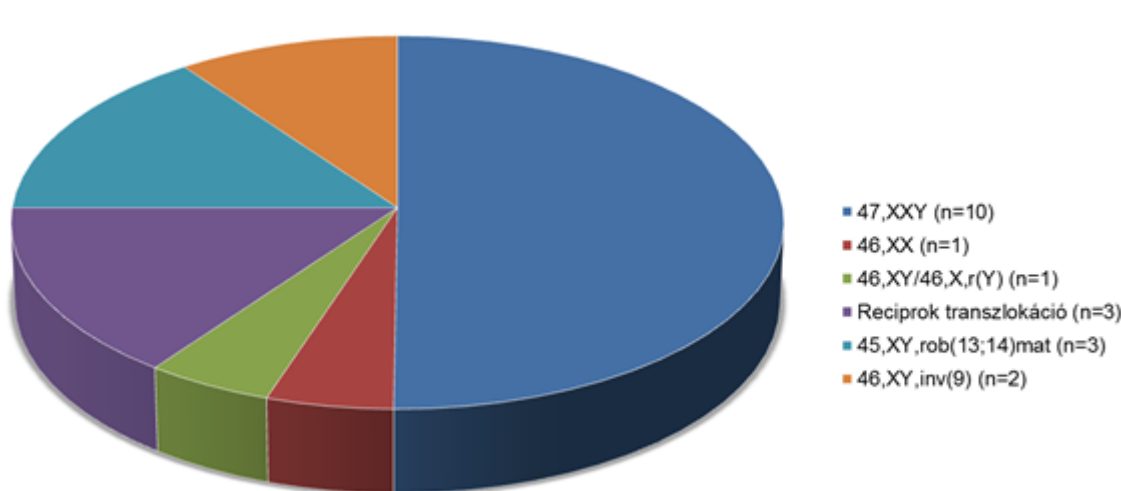
4.1. Citogenetika és molekuláris citogenetika

A citogenetikai vizsgálat során autoszómális számbeli eltérést egyetlen esetben sem találtunk. Ez nem meglepő, hiszen ezek a kiegyensúlyozatlan eltérések rendszerint már születéskor (sőt már prenatálisan) felismerhető durva fenotípusos elváltozásokkal járnak. Ezért nőkben és férfiakban csak kiegyensúlyozott autoszómális eltérések vagy csak a nemi kromoszómák számbeli eltérései várhatók.

Citogenetikai eltérést a 305 vizsgált férfi közül 20 betegben észleltünk (6,6%), 12 esetben (3,9%) a nemi kromoszómák rendellenességeit igazoltuk. Tíz férfiben Klinefelter-szindrómát (47,XXY, 3,3%), egy esetben (0,33%) mozaik ring Y kromoszómát mutattunk ki. Egy férfi vizsgálata során 46,XX kariotípus mellett az *SRY* gént FISH módszerrel az X kromoszóma rövid karján detektáltuk (**3. ábra**). Hat betegben (2%) autoszómákat érintő kiegyensúlyozott transzlokációkat mutattunk ki; három esetben reciprok transzlokációt - 46,XY,t(3;6)(q21;q23), 46,XY,t(2;5)(p13;q21), 46,XY,t(7;20)(p15;p13) - három további esetben Robertson-transzlokációt (45,XY,rob(13;14)mat). Két alkalommal igazoltuk (0,66%) a 9-es kromoszóma pericentrikus inverzióját. Az infertilis férfiak kariotípus eltéréseit a **4. ábrán** mutatjuk be.



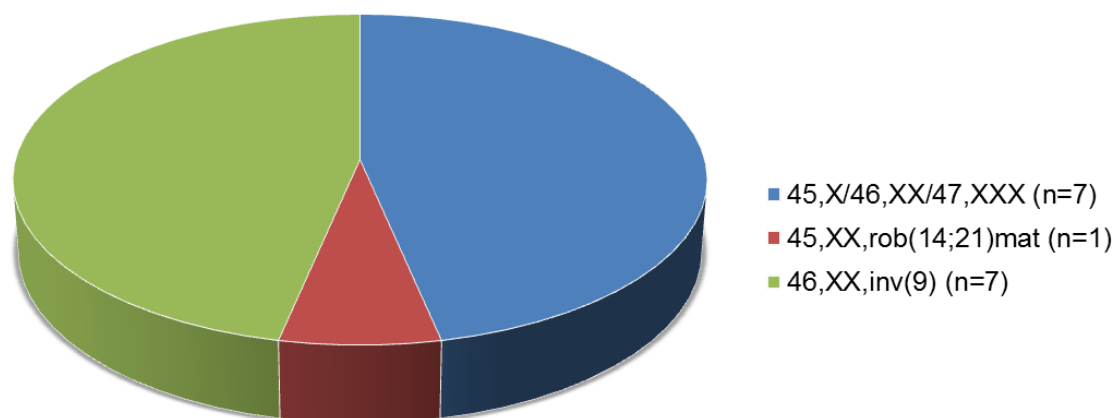
3. **ábra.** X/SRY transzlokáció FISH képe 46,XX kariotípusú infertilis férfi esetében. Zöld szignál az X kromoszómát, piros szignál az SRY gént jelzi metafázisú és interfázisú sejteken.



4. **ábra.** Citogenetikai eltérések a vizsgált infertilis férfiakban. A 305 vizsgált eset közül 20 beteg hordozott citogenetikai eltérést (6,6%).

Az infertilis nők esetében a 195 betegből 15 esetben (7,7%) mutattunk ki citogenetikai eltérést (5. **ábra**). Az egyik leggyakoribb kromoszóma aberrációnak a nemi kromoszómák számbeli eltérései bizonyultak mozaikos formában: a 195 esetből hét (3,6%) esetben találtunk

45,X/46,XX/47,XXX kariotípust, a mozaicizmus mértékét FISH segítségével pontosítottuk: átlagosan a sejtek 93%-ában két, 4,5%-ában egy és 2,5%-ában három X kromoszómát igazoltunk. Egy esetben (0,5%) Robertson-transzlokációt (45,XX,rob(14;21)mat), hét esetben (3,6%) a 9-es kromoszóma pericentrikus inverzióját mutattuk ki.



5. ábra. Citogenetikai eltérések a vizsgált infertilis nőkben. A 195 vizsgált eset közül 15 beteg hordoz citogenetikai eltérést (7,7%).

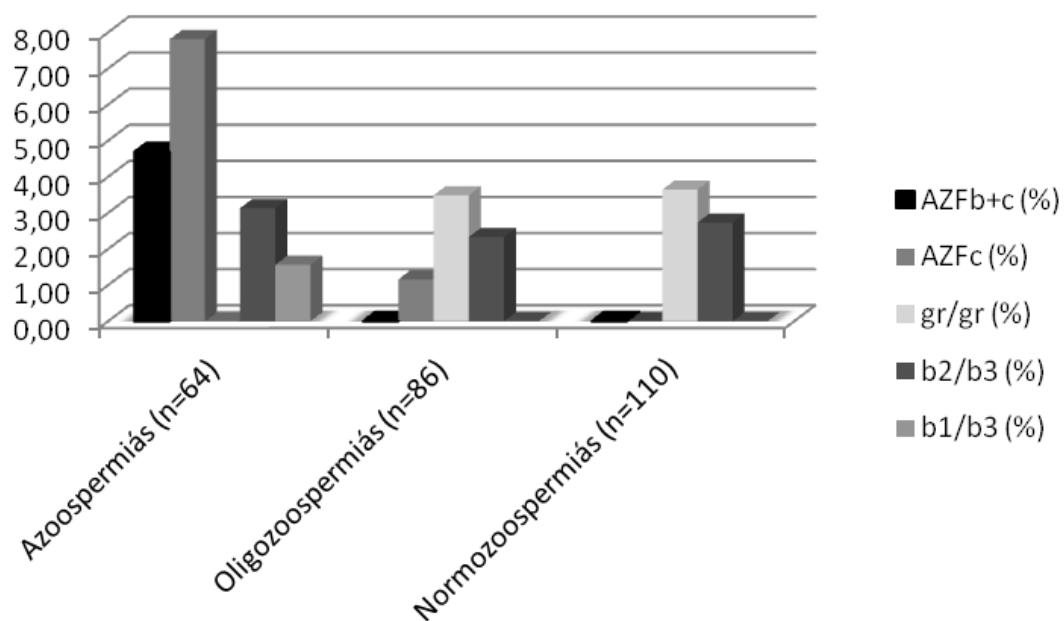
4.2. Az Y kromoszóma AZF régiójának vizsgálata

A 64 azoospermias férfi közül nyolc esetben találtunk Y kromoszóma mikrodélációt, háromban AZFb+c (4,69%) és öt esetben AZFc (7,81%) deléciót. Az AZFc régióban két típusú parciális mikrodélációt mutattunk ki: két esetben b2/b3 deléciót (3,13%), egy esetben pedig b1/b3 deléciót (1,56%). A 86 oligozoospermias férfi közül egyben teljes AZFc régiót érintő deléciót (1,16%), öt férfiben az AZFc régió belül parciális mikrodélációt igazoltunk: ez az utóbbi három esetben gr/gr (3,49%), két esetben b2/b3 deléciónak bizonyult (2,33%). A normozoospermias csoportban (n=110) hét esetben parciális deléció volt kimutatható: négy gr/gr (3,64%) és három b2/b3 deléció (2,73%). A bizonyítottan fertilis esetek között Y kromoszóma mikrodéláció és parciális mikrodéláció nem fordult elő. Az eltérő

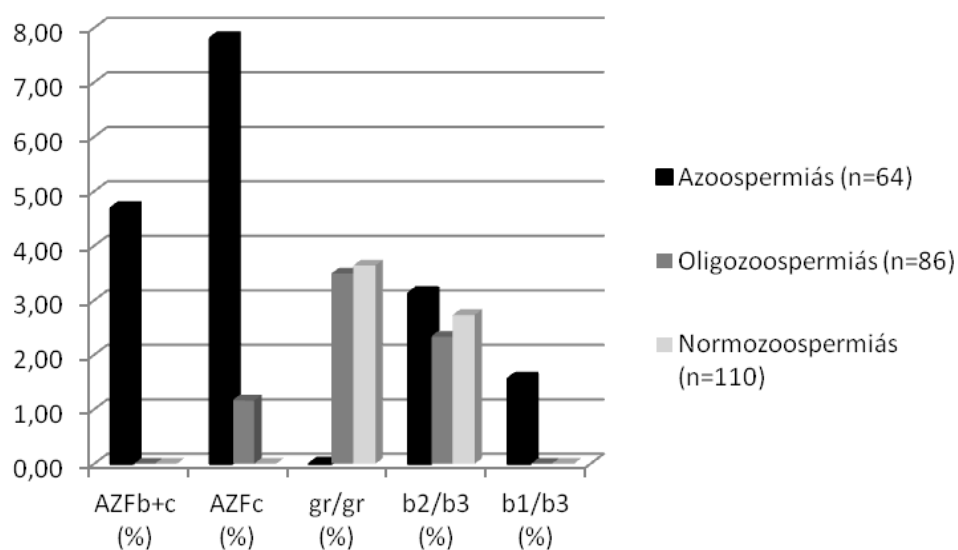
spermiumszámú csoportokban talált deléció típusokat és az egyes deléciók előfordulási gyakoriságát az **6. ábrán** foglaltuk össze.

AZFb+c deléciót és b1/b3 típusú parciális mikrodeléciót csak azoospermiás esetekben találtunk; AZFc deléció szignifikánsan gyakrabban fordult elő az azoospermiások között, mint az oligozoospermiás csoportban ($P<0,05$), míg normozoospermiás férfiakban AZFc deléciót nem mutattunk ki. A gr/gr deléció azoospermiában nem fordult elő és nincs szignifikáns különbség e deléció előfordulási gyakoriságában az oligozoospermiás és normozoospermiás csoportok között. A b2/b3 parciális deléciót mindhárom csoportban kimutattuk, de szignifikáns különbség az egyes csoportok között nem volt igazolható.

A



B

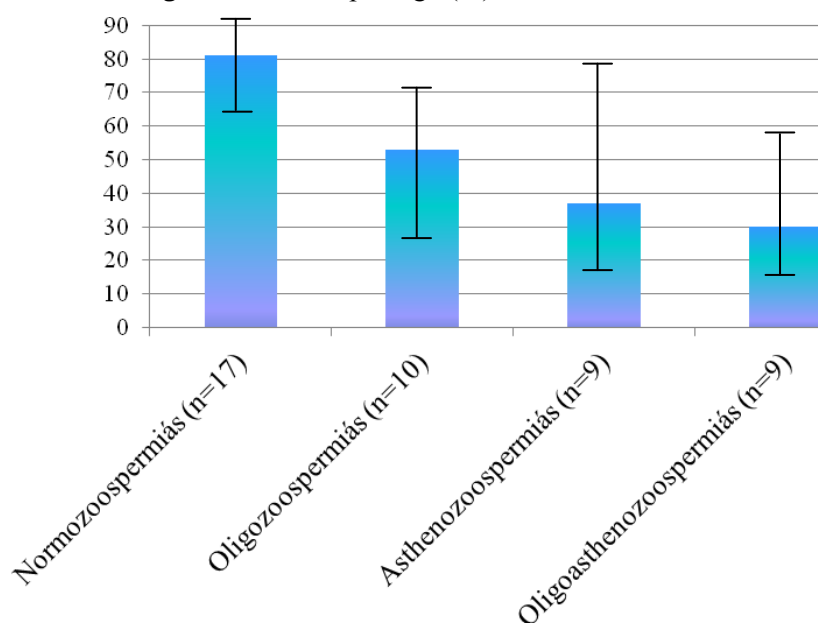


6. ábra. Az Y kromoszóma mikrodeléciók és parciális mikrodeléciók előfordulása az azoo-, oligozoo- és normozoospermia csoportokban (A) és az egyes deléciók előfordulási gyakorisága (B). Az AZFb és AZFc régiókat érintő mikrodeléciók azo- és súlyos oligozoospermia férfiakban, a gr/gr deléció oligo- és normozoospermiaásokban, a b2/b3 deléció mindhárom csoportban, míg a b1/b3 deléció csak azoospermiaásokban fordult elő.

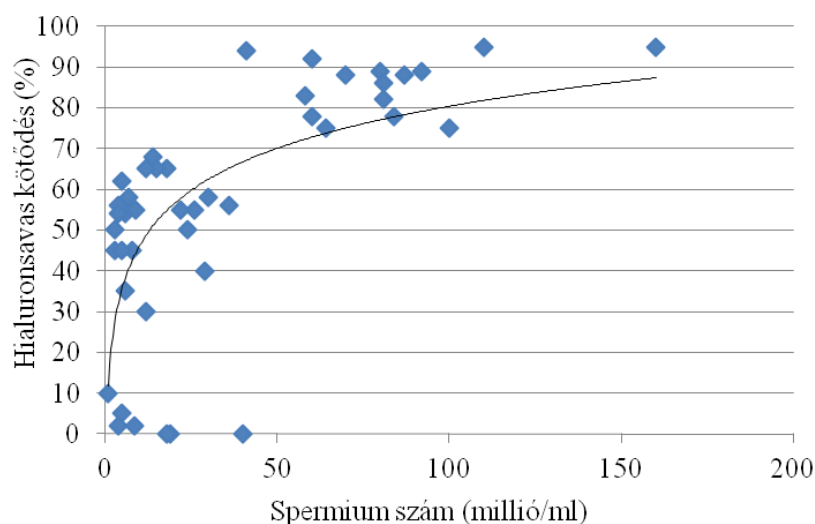
4.3. Spermiumok hialuronsav-kötő képességének vizsgálata

Az átlagos hialuronsav-kötődési képesség a normozoospermias kontroll csoportban (n=17) 81%, az oligozoospermias csoportban (n=10) 53%, az asthenozoospermias csoportban (n=9) 37% és az oligoasthenozoospermias csoportban (n=9) 30% volt (7. ábra). A normozoospermias csoport hialuronsav-kötődési képessége szignifikánsan magasabb volt, mint az oligozoospermias, asthenozoospermias és az oligoasthenozoospermias férfiaké ($P < 0,001$). A 8. ábrán az összes vizsgált férfi spermium koncentrációjának függvényében ábrázoltuk a HA kötődés mértékét.

A spermiumok átlagos HA-kötő képessége (%)



7. ábra. A vizsgált különböző spermium koncentrációjú infertilis férfiak hialuronsav kötő képessége. Az egyes csoportok szélső értékei jelölve vannak.

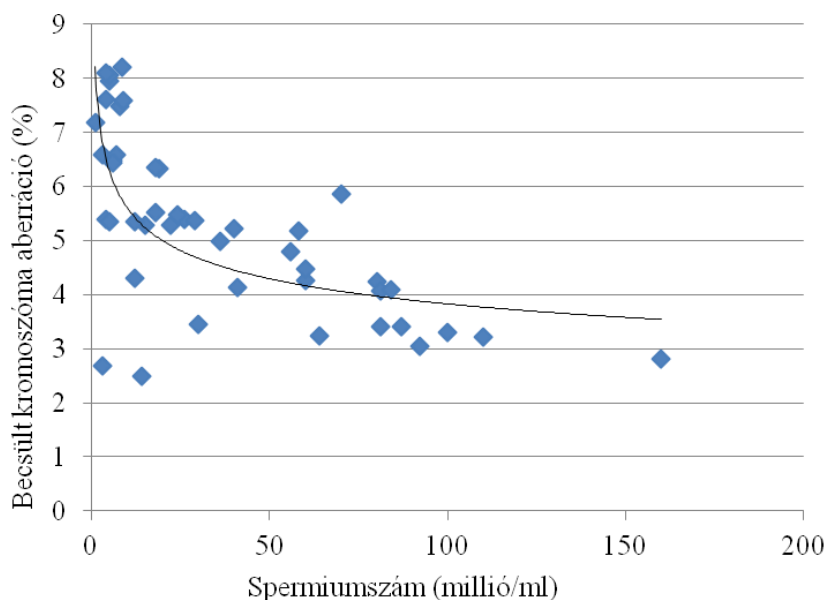


8. ábra. A vizsgált infertilis férfiak hialuronsav kötő képessége a spermiumszám függvényében.

4.4. A spermiumok kromoszóma aberrációinak meghatározása

A spermiumok kromoszóma aberrációinak meghatározása FISH vizsgálattal történt. Az X/Y arány minden vizsgált csoportban közel 1:1 volt. A nemi kromoszómák diszómia frekvenciája szignifikánsan magasabb volt az oligoasthenozoospermias csoportban a másik három csoporttal összehasonlítva ($P=0,001$ normozoospermias, $P=0,014$ oligozoospermias és $P=0,004$ asthenozoospermias csoporttal szemben). Szignifikánsan magasabb 17-es kromoszóma diszómia frekvenciát találtunk az oligoasthenozoospermias csoportban a normozoospermias ($P=0,0001$), az oligozoospermias ($P=0,0019$) és az asthenozoospermias ($P=0,0011$) betegekhez hasonlítva. A teljes diploidia frekvencia az oligoasthenozoospermias betegek esetén szignifikánsan magasabb, mint a másik három csoportban (normozoospermias kontrollok esetén $P<0,0001$, oligozoospermias férfiaknál $P=0,03$ és az asthenozoospermias csoportban $P=0,001$). Szignifikáns különbséget találtunk a becsült számbeli kromoszóma aberráció gyakorisága tekintetében az oligoasthenozoospermias és a normozoospermias ($P<0,001$), az oligoasthenozoospermias és az oligozoospermias ($P=0,004$) illetve az oligoasthenozoospermias és az asthenozoospermias ($P=0,001$) csoportok között. Szignifikáns

különbséget mutattunk ki továbbá a 17-es kromoszóma diszómia ($P=0,0019$), diploidia ($P=0,001$) és a becsült számbeli kromoszóma aberrációk gyakoriságában ($P=0,002$) az asthenozoospermiás és a normozoospermiás csoportok között. A 17-es kromoszóma diszómia frekvenciája szignifikánsan magasabb volt az oligozoospermiás csoportban, mint a normozoospermiás esetekben ($P=0,0387$). A **9. ábrán** a 45 vizsgált férfi spermium koncentrációjának függvényében ábrázoltuk a becsült számbeli kromoszóma aberráció gyakoriságot. A spermiumok kromoszóma vizsgálatának eredményeit a **3.**, a statisztikai elemzés eredményeit a **4. táblázat** tartalmazza.



9. ábra. A vizsgált infertilis férfiak becsült számbeli kromoszóma aberráció gyakorisága a spermiumszám függvényében.

Csoportok	Normozoospermiás^a (n=17, Átlag)	Oligozoospermiás^b (n=10, Átlag)	Asthenozoospermiás^c (n=9, Átlag)	Oligoasthenozoospermiás^d (n=9, Átlag)
X/Y arány	1,07	1,07	1,08	1,08
Diszómia (%)				
XY	0,15	0,17	0,17	0,21
XX	0,1	0,12	0,12	0,15
YY	0,08	0,09	0,08	0,12
Teljes nemi kromoszóma diszómia	0,34	0,38	0,37	0,48
17,17	0,07	0,09	0,1	0,14
Diploidia (%)				
XY	0,08	0,13	0,12	0,18
XX	0,06	0,08	0,09	0,13
YY	0,04	0,05	0,06	0,09
Teljes	0,17	0,25	0,26	0,4
Becsült számbeli kromoszóma aberráció (%)	3,99	5,24	5,45	7,42

^a Összesen 89452 spermium került értékelésre

^b Összesen 48461 spermium került értékelésre

^c Összesen 45860 spermium került értékelésre

^d Összesen 43666 spermium került értékelésre

3. táblázat. A 17-es kromoszóma diszómiák, a nemi kromoszóma diszómiák, diploidiak és a becsült számbeli kromoszóma aberrációk a vizsgált beteg csoportokban.

		Oligozoospermiás csoport				Asthenozoospermiás csoport				Oligoasthenozoospermiás csoport			
		Nemi kr. diszómia	17 kr. diszómia	Diploidia	Becs. kr. ab.*	Nemi kr. diszómia	17 kr. diszómia	Diploidia	Becs. kr. ab.*	Nemi kr. diszómia	17 kr. diszómia	Diploidia	Becs. kr. ab.*
Normozoospermiás csoport	Nemi kr. diszómia	0,131				0,331				0,001			
	17 kr. diszómia	0,0387				0,0019				0,0001			
	Diploidia		0,315				0,001				<0,0001		
	Becs. kr. ab.*			0,053				0,002					<0,001
Oligozoospermiás csoport	Nemi kr. diszómia					0,325				0,014			
	17 kr. diszómia						0,709				0,0019		
	Diploidia							0,540				0,030	
	Becs. kr. ab.*								0,595				0,004
Asthenozoospermiás csoport	Nemi kr. diszómia									0,004			
	17 kr. diszómia										0,0011		
	Diploidia											0,001	
	Becs. kr. ab.*												0,001

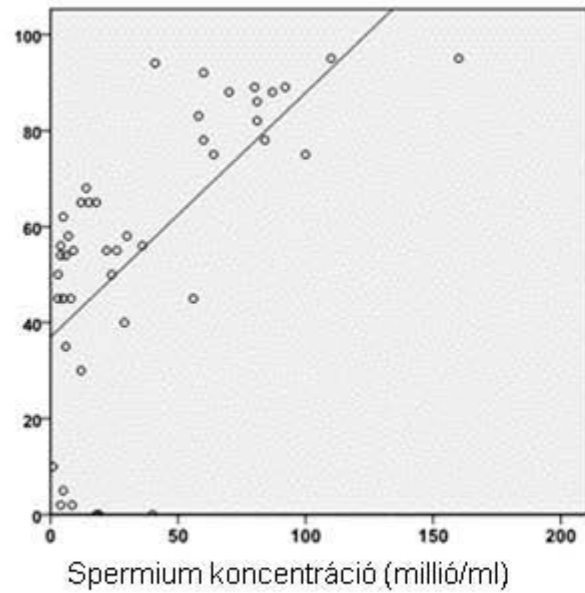
* Becsült számbeli kromoszóma aberráció gyakoriság

4. táblázat. A statisztikai értékelés eredménye (*P* értékek) a különböző spermiumkoncentrációjú csoportok között. A vastaggal szedett értékek a szignifikáns eltéréseket mutatják.

4.5. Összefüggés a spermium koncentráció, a hialuronsav-kötődési képesség és a becsült számbeli kromoszóma aberráció gyakoriság között

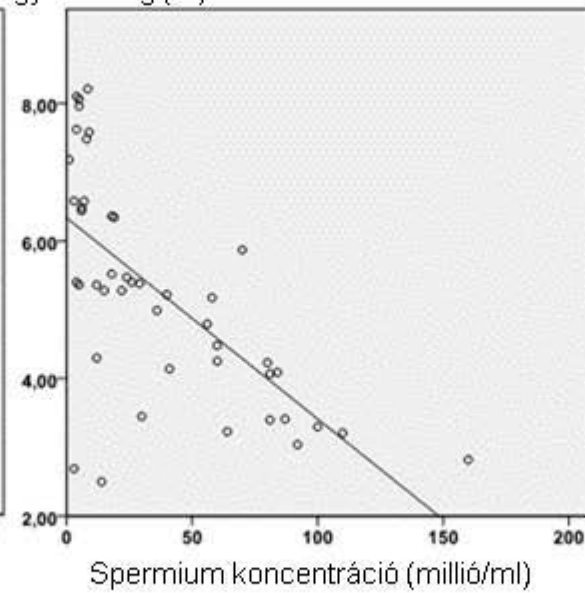
A spermium koncentráció, a hialuronsav-kötődési képesség és a becsült számbeli kromoszóma aberráció gyakoriság közötti összefüggést Pearson korrelációs (r) analízis segítségével határoztuk meg 28 infertilis és 17 normozoospermiás férfi esetében. A vizsgált férfiak esetében pozitív korrelációt ($r=0,658$) találtunk a spermium koncentráció és a hialuronsav-kötődési képesség (**10A. ábra**), fordított korrelációt a spermium koncentráció és a becsült számbeli kromoszóma aberráció gyakoriság ($r= - 0,668$) (**10B. ábra**), valamint a hialuronsav-kötődési képesség és a becsült számbeli kromoszóma aberráció gyakoriság ($r= - 0,682$) (**10C. ábra**) között.

Hialuronsav-kötődési képesség (%)



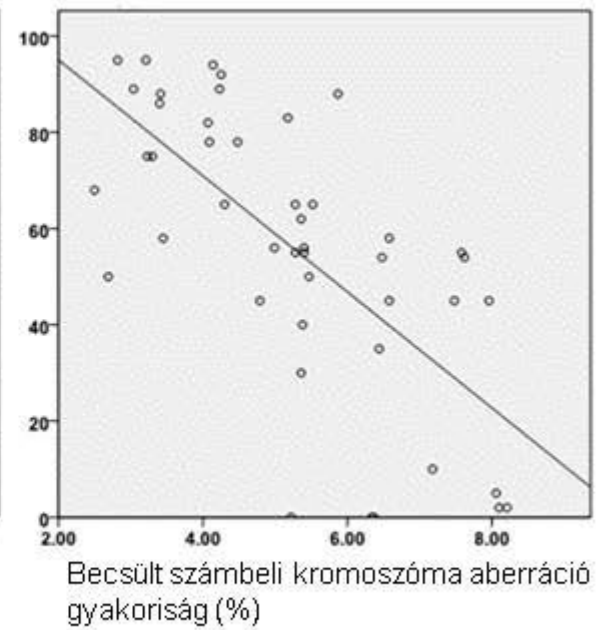
A

Becsült számbeli kromoszóma aberráció gyakoriság (%)



B

Hialuronsav-kötődési képesség (%)

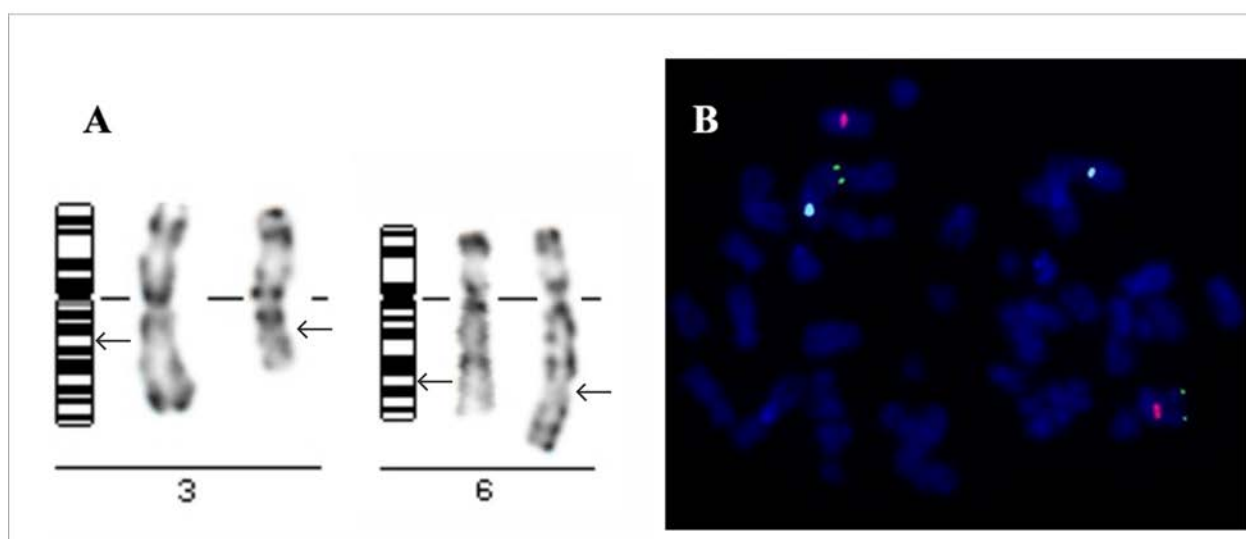


C

10. ábra Összefüggés a spermium koncentráció, hialuronsav-kötődési képesség és a becült számbeli kromoszóma aberráció gyakoriság között.

4.6. Szegregációs analízis

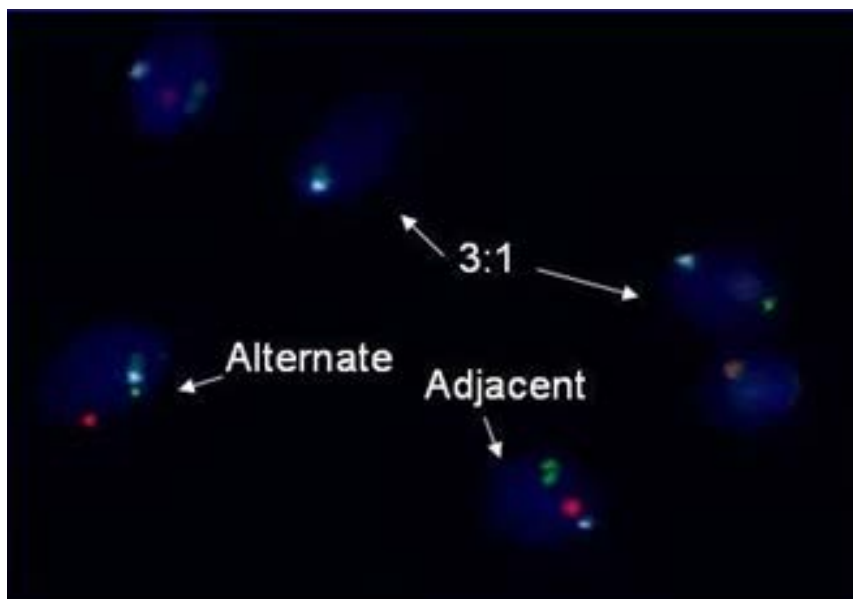
Egy férfiben a kromoszóma analízis kiegyensúlyozott transzlokációt igazolt a 3-as és 6-os kromoszómák hosszú karjai között. A beteg kariotípusa 46,XY,t(3;6)(q21;q23) volt, melyet FISH analízissel megerősítettünk (**11. ábra**). A vizsgálatot perifériás vér limfocita tenyészet metafázisos sejtjein végeztük 3qter lókuszt specifikus, 3-as és 6-os kromoszóma centromér specifikus próbák segítségével a reciprok transzlokáció igazolására.



11. ábra. A t(3;6)(q21;q23) kiegyensúlyozott reciprok transzlokáció citogenetikai és FISH képe. (A) A részleges GTG-sávok kariogram t(3;6)(q21;q23) átrendeződést mutat. A kromoszómák mellett az idiogrammok is láthatók. A nyilak a kóros kromoszómákat mutatják. (B) A metafázisos kromoszómákon végzett FISH vizsgálat eredménye 3-as kromoszóma centromér specifikus (CEP3) (piros), 6-os kromoszóma centromér specifikus (CEP6) (kék), és 3qter régió specifikus (zöld) próbák segítségével. Egy zöld (3qter) és egy kék szignál (CEP6) ugyanazon a kromoszómán igazolja a transzlokációt a 3-as és 6-os kromoszómák között.

A spermium sejtek FISH vizsgálata során a spermatozoák szignálmintázatából következtettünk a sejtek kromoszóma szegregációjának módjára (**12. ábra**). A spermium sejteken végzett szegregációs analízis eredményét az **5. táblázatban** foglaltuk össze. Az átlagos hibridizációs hatékonyság 99,5%-os volt. Összesen 2002 spermatozoát analizáltunk. A

sejtek 46,8%-ában normál/kiegyensúlyozott (alternate) szegregációs mintázatot láttunk. A kiegyensúlyozatlan kromoszóma szegregáció következtében a sejtek 53,2%-a kóros szignálmintázatot mutatott: adjacent 1 szegregáció a sejtek 26,07%-ában, adjacent 2 a sejtek 3,63%-ában, míg a 3:1 típusú szegregáció a sejtek 8,49%-ában volt megfigyelhető. Diploid és 4:0 típusú szegregációs mintázatú spermiumok 0,45%-ban voltak jelen. Egyéb, a fenti csoportba nem sorolható szignálmintázatot a spermiumok 4,54%-ban találtunk.



12. ábra. A t(3;6)(q21;q23) kiegyensúlyozott reciprok transzlokációt hordozó infertilis férfi szegregációs analízise során kapott különböző szignálmintázatú spermiumsejtek FISH képe. A vizsgálatot a 3-as kromoszóma centromér specifikus (CEP3) (piros), a 6-os kromoszóma centromér specifikus (CEP6) (kék), és a 3qter régió specifikus (zöld) próbák segítségével végeztük.

Szegregáció típus		Mintázat	n	%
Alternate	n; n,-3,-6,+der(3),+der(6)	PZK	937	46,80
Adjacent 1	n,-3,+der(3)	PK	308	15,38
	n,-6,+der(6)	PZZK	214	10,70
		Teljes	522	26,07
Adjacent2	n,-6,+der(3)	PPZ	87	4,35
	n,-3,+der(6)	ZKK	106	5,29
	n,-6,+3	PPZZ	25	1,25
	n,-3,-6,+der(3),+der(3)	PP	23	1,15
	n,-3,+6	KK	17	0,85
	n,-3,-6,+der(6),+der(6)	ZZKK	15	0,75
		Teljes	273	13,63
3:1	n,-3,-6,+der(3)	P	27	1,35
	n,+der(6)	PZZKK	7	0,35
	n,-3,-6,+der(6)	ZK	53	2,65
	n,+der(3)	PPZK	4	0,20
	n,-3	K	15	0,75
	n,-6,+der(3),+der(6)	PPZZK	7	0,35
	n,-6	PZ	46	2,30
	n,-3,+der(3),+der(6)	PZKK	11	0,55
		Teljes	170	8,49
Diploid	2n,t(3;6)	PPZZKK	9	0,45
Egyéb		Teljes	91	4,54
Teljes			2002	

5. táblázat. A meiotikus szegregációs vizsgálat eredménye. n: haploid, P: piros jel (CEP3), K: kék szín (CEP6), G: zöld szignál (3qter)

Az alternate szegregációs mód volt a leggyakoribb meiotikus mintázat, melyet sorrendben az adjacent 1, adjacent 2 és a 3:1 szegregáció követett. Az adjacent 1 szegregáció két típusa (5. táblázat) 1,5:1 arányban, míg az adjacent 2 szegregáció termékei két kivételtől eltekintve közel 1:1 arányban keletkeztek. Az adjacent 2 szegregáció során a PPZ ($P<0,0001$) és a ZKK ($P<0,0001$) szignál mintázatú sejtek magasabb gyakoriságát az intersticiális rekombináció hiányával magyarázzuk (Vozdova és mtsai, 2008). Szignifikáns különbséget

találtunk a 3:1 típusú szegregációs mód termékei között, mivel a hipohaploid sejtek (P, ZK, K és PZ) gyakrabban fordultak elő, mint a hiperhaploidok (PZZKK, PPZK, PPZZK és PZKK) ($P < 0,0001$).

Az interkromoszómális hatás vizsgálatához a beteg becsült számbeli kromoszóma aberrációinak gyakoriságát két kontroll csoportéhoz hasonlítottuk: ez a transzlokációt hordozó férfi spermiumaiban szignifikánsan magasabb volt, mint a kontrollok esetében ($P < 0,0001$). Az eredményeket a **6. táblázatban** foglaltuk össze. A vizsgálat során a spermiumok X, Y és 17-es kromoszómainak FISH szignál mintázatát tanulmányoztuk a transzlokációt hordozó férfi, öt fiatal normozoospermiás spermium donor és öt oligozoospermiás férfi esetében. Az X/Y arány a beteg és a két kontroll csoport esetében is közel 1:1 volt. A nemi kromoszómák diszómia frekvenciáját szignifikánsan magasabbnak találtuk a transzlokációt hordozó férfi esetében, mint a normozoospermiás ($P < 0,05$) és az oligozoospermiás egyénekben ($P = 0,05$). A 17-es kromoszóma diszómia frekvenciája magasabb volt a hordozó férfi esetében, mint a normozoospermiás és az oligozoospermiás férfiaknál, de a különbség nem volt szignifikáns ($P = 0,11$ and $P = 0,30$). A teljes diploidia frekvencia szintén magasabb volt a kiegyensúlyozott reciprok transzlokáció hordozó esetében, mint a másik két kontroll csoport esetében ($P < 0,0001$ a normozoospermiás csoport esetében és $P = 0,006$ az oligozoospermiás férfiaknál).

	Transzlokáció hordozó ^a	Normozoospermiás kontroll csoport ^b (Átlag)	Oligozoospermiás kontroll csoport ^c (Átlag)
X/Y arány	1,06	1,05	1,08
Diszómia (%)			
XY	0,26	0,14	0,16
XX	0,16	0,11	0,11
YY	0,14	0,11	0,09
Teljes nemi kromoszóma	0,56	0,36	0,36
17,17	0,14	0,07	0,09
Diploidia (%)			
XY	0,22	0,07	0,12
XX	0,12	0,04	0,07
YY	0,10	0,04	0,04
Teljes	0,44	0,14	0,22
Becsült számbeli kromoszóma aberráció (%)	7,70	3,73	4,71

^a Összesen 5089 spermium került értékelésre

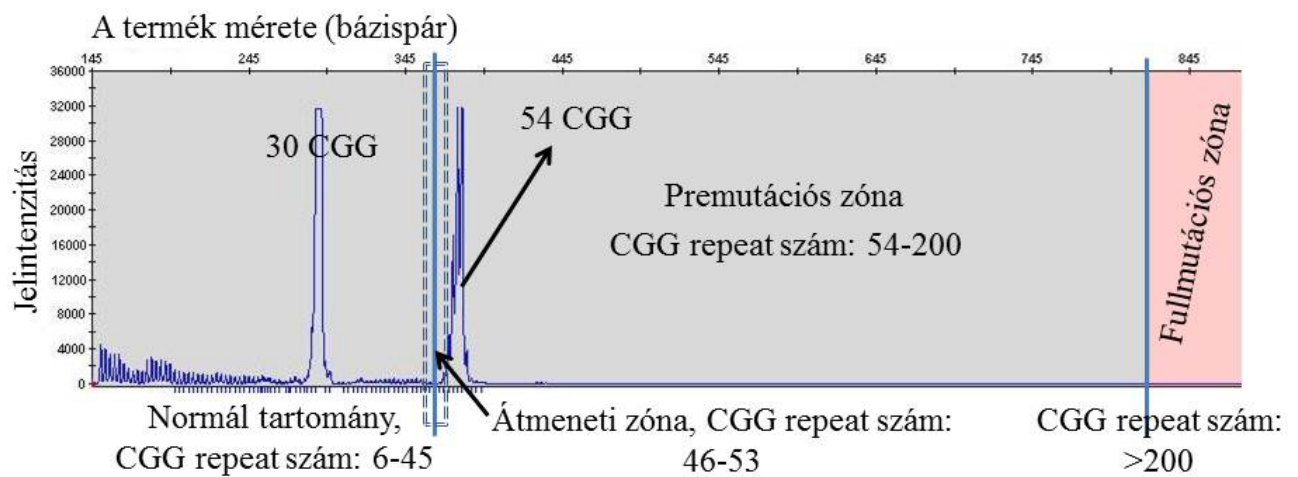
^b Összesen 27535 spermium került értékelésre

^c Összesen 23840 spermium került értékelésre

6. táblázat. A 17-es és a nemi kromoszómák diszómia és diploidia frekvenciája, valamint a becsült számbeli kromoszóma aberráció gyakoriság a vizsgált kiegyensúlyozott reciprok transzlokáció hordozó, a normozoospermiás és az oligozoospermiás kontrollok esetében.

4.7. Az *FMR1* gén vizsgálata

Tizenhét korai ovárium elégtelenségben szenvedő nő közül két esetben igazoltuk az *FMR1* gén premutációját (11,8%). Az egyikben mozaikos formában (repeat szám=59), míg a másikban az összes szomatikus sejtben jelen volt a premutáns allél (repeat szám=54). A 15 normális, tripletexpanszió nélküli nő átlagos CGG tripletszáma 23 volt mindkét allélon. A **13. ábrán** az egyik *FMR1* premutáns beteg fragmentanalízisének elektroferogramját mutatjuk be. A termékcsúcsok intenzitásából és elhelyezkedéséből következtetünk a repeatek számára. A pontos repeat számot GeneMapper 4.0/4.1 szoftver segítségével határoztuk meg.



13. ábra. Az *FMR1* gén 54 CGG tripletét hordozó premutáns beteg fragmentanalízisének elektroferogramja. Az ábrán látható, hogy az egyik allél a normál tartományba esett (repeat szám 30). A termékcsúcsok intenzitása és elhelyezkedése alapján a pontos repeat számot GeneMapper 4.0/4.1 szoftver segítségével határoztuk meg.

5. MEGBESZÉLÉS

5.1. Kromoszóma szintű eltérések férfi infertilitásban

A férfi infertilitás hátterében az esetek mintegy 5%-ában áll kromoszómális ok, amely azoospermia esetén 15%-ra emelkedik (Antonelli és mtsai, 2000; Egozcue és mtsai, 2000; Hargreave, 2000; Foresta és mtsai, 2002; Bellovits és mtsai, 2006; Krausz, 2011). Vizsgálataink során a legtöbb esetben Klinefelter szindróma (3,3%), vagy a nemi kromoszómák egyéb szám-, vagy szerkezetbeli eltérése állt a férfi eredetű infertilitás hátterében (0,66%), míg az autoszómákat érintő citogenetikai eltérések gyakorisága 2% volt. A 9-es kromoszóma pericentrikus inverzióját infertilis férfiakban gyakoribbnak (0,66%) találtuk az átlag populációhoz (1,65%) képest (Kalz és Schwanitz, 2004).

A Klinefelter szindróma a férfi infertilitás leggyakoribb genetikai oka. Gyakorisága az átlag populációban 0,1-0,16%, míg a nemzőképtelen férfiak között 3-11%-ban fordul elő (Lanfranco és mtsai, 2004; Krausz, 2011). A Klinefelter szindróma 80–90%-át a klasszikus 47,XXY forma, míg a fennmaradó 10–20%-ot magasabb fokú aneuploidia és mozaicizmus alkotja (48,XXXY, 48,XXYY, 49XXXXY, 46,XY/47XXY). Vizsgálati anyagunkban tíz esetben tiszta 47,XXY kariotípust találtunk. A szindróma alapját a szülői ivarsejtek fejlődésekor a meiózis során, vagy a korai embrionális mitotikus sejtosztódás során bekövetkező non-diszjunkció képezi. A legújabb tanulmányok a Klinefelter-szindrómát az androgének szerepével és az X kromoszómán lévő androgén-receptor gén (AR) CAG repeat polimorfizmusával hozzák összefüggésbe. Kimutatták, hogy Klinefelter-szindrómában a két példányban jelenlévő AR allél közül a rövidebb inaktiválódik, míg az aktív hossza egyenes arányban van a testmagassággal és a gynecomastia meglétével (Lanfranco és mtsai, 2004). Bár a Klinefelter szindróma az azoospermia leggyakoribb kromoszómális oka, néhány olyan esetről is beszámoltak, amikor spermiumot tudtak nyerni a páciensből (Bielanska és mtsai, 2000; Pienna Videau és mtsai 2001; Visootsak és mtsai, 2001; Huynh és mtsai, 2002), és in

vitro fertilizáció során gyermeke született a betegnek (Nodar és mtsai, 1999, Hargreave, 2000). A mozaik Klinefelter-szindrómás betegek spermiumai nagyrészt haploidok, így nagy eséllyel egészséges gyermekük születhet (Bielanska és mtsai, 2000; Morel és mtsai, 2000; Staessen és mtsai, 2003). A hiperhaploid spermiumok megnövekedett gyakorisága miatt ajánlott a preimplantációs genetikai diagnosztika (PGD) elvégzése.

A 47,XYY kariotípus 1000 élveszületett fiúgyermekből egyet érint (0,1%). Infertilis férfiak körében ez az arány kisebb (0,084%). Az érintett férfiak nagy része fenotípusosan normális, változatos klinikai megjelenéssel, spermiumtermelő képességük a súlyos oligozoospermiától a normospermiáig terjedhet, gyakran egészséges gyermekük születik (Wang és mtsai, 2000; Fagerstrom és mtsai, 2002). A kromoszóma-rendellenességek, spontán abortuszok kockázata azonban megnő a 47,XYY kariotípusú férfiak utódaiban, ugyanis ezeknél a személyeknél a spermiumban előforduló nemi kromoszóma diszómia gyakorisága (0,2 - 1%) szignifikánsan magasabb az átlag populációhoz (0,1%) képest (Zhang és Lu, 2004). A 47,XYY férfiaknál kis gyakorisággal lehet számfeletti nemi kromoszómát találni a spermiumokban, amit a számfeletti Y kromoszóma eliminálódásával magyaráznak (Lim és mtsai, 1999; Martin és mtsai, 2001). Munkánk során az infertilis férfiak között 47,XYY kariotípus nem fordult elő.

Szerkezeti Y kromoszóma-eltérések közül infertilitásban a leggyakoribb és fenotípusos következményekkel is járó citogenetikai eltérés a ring Y kromoszóma (incidenciája 0,5% alatti). A kromoszóma aberráció a spermatogenezisért felelős gének megzavarása révén vezet azoospermiához, vagy súlyos oligozoospermiához (Foresta és mtsai, 2002). A ring Y kromoszóma a spermatogenezis során gyakran elvész, ezért a megszületett gyermekek Turner - szindrómában szenvednek. A konstitúcionálisan nem mozaikos ring Y kromoszómával született fiúgyermekek incidenciája nagyon alacsony (Gisselsson és mtsai, 2003). Gyakoribbak a mozaikos esetek, ahol egyes sejtvonalakban elvész az aberráns Y

kromoszóma, vagy normál Y kromoszómát tartalmazó sejtekkel együtt jelenik meg mozaikos formában (Bertini és mtsai, 2005). Az általunk vizsgált esetben a kariotípus 46,XY/46,X,r(Y) volt. A beteg súlyos oligozoospermiáját valószínűleg az egyes sejtvonalakban jelenlévő aberráns AZF régiót tartalmazó Y kromoszóma okozta.

A 46,XX kariotípusú férfiak fenotípusának hátterében több genetikai tényező állhat, változatos klinikai képet eredményezve. Igen ritka abnormalitás, 20 000 férfiból egyet érint (Maduro és Lamb, 2002). Az esetek legnagyobb részének hátterében (80%) az Y kromoszóma *SRY* génjének autoszómára vagy az X kromoszómára való transzlokációja áll (Zenteno-Ruiz és mtsai, 2001). A transzlokálódott gén meghatározza a férfi fenotípust, de az Y kromoszóma spermatogenezisért felelős régiójának (AZF régió) hiánya miatt a beteg azoospermiás, a herék hipopláziásak, ezen túlmenően gynecomastia és néha cryptorchismus is megfigyelhető (Sánchez Fuentes és mtsai, 2012). Az *SRY* negatív esetekben kétes nemi szervek alakulnak ki (Vetro és mtsai, 2011). Az *SRY* pozitív esetek diagnózisa nehéz, mivel normális másodlagos férfi nemi jelek alakulnak ki, s gyakran az egyedüli tünet az infertilitás. Laboratóriumunkban egy esetben diagnosztizáltunk 46,XX férfi fenotípust, ahol az *SRY* gén az egyik X kromoszómára transzlokálódott. Ilyen esetekben a hiányzó spermatogenezis miatt az IVF során donor spermium alkalmazása szükséges.

Az autoszómák kiegyensúlyozott reciprok és Robertson transzlokációi szerepet játszhatnak az infertilitás kialakításában (Foresta és mtsai, 2002; Ferlin és mtsai, 2006). Az autoszómális transzlokációk gyakoriságát a meddőség miatt vizsgáltak között 5,63%-nek találták a kontroll csoport 1,28%-es gyakoriságához képest (Chandley és mtsai, 1975). Az oligozoospermiás és azoospermiás férfiak körében magasabbnak bizonyult a Robertson transzlokációt hordozók aránya az átlag populációban észlelttel szemben (Nagvenkar és mtsai, 2005). A reciprok transzlokáció ritkább jelenség a Robertson transzlokációnál, infertilis férfiak között körülbelül 1,5%-ban fordul elő. Többnyire az azoospermiásoknál figyelhető

meg (0,9%), míg az oligozoospermiásokat ritkábban érinti (0,6%) (Mark és Sigman, 1999; Estop és mtsai, 2000; Pernice és mtsai, 2002; Sazci és mtsai, 2005; Mikelsaar és mtsai, 2006). Az autoszóma rendellenességek okozta infertilitás az e kromoszómákon található, a nemi differenciálódásban szerepet játszó gének mutációjával, elvesztésével, vagy egyéb módon történő inaktiválódásával magyarázható (Kaur és mtsai, 2004; Mikelsaar és mtsai, 2006). Másrészt a meiózis során a rendellenes homológ kromoszóma párok a crossing over alatt interkromoszómális hatás révén a többi kromoszóma aneuploidiáját is okozhatják (Mikelsaar és mtsai, 2006). Laboratóriumunkban három esetben reciprok transzlokációt és három esetben Robertson-transzlokációt mutattunk ki. A három reciprok transzlokáció közül egy esetben - 46,XY,t(3;6)(q21;q23) – olyan ritka eltérést találtunk, amelyet eddig nem írtak le az infertilitás okaként. A vizsgált férfi spermiumainak több mint fele (53,2%) abnormális kromoszóma készlettel rendelkezett, melynek következtében a hordozó férj feleségénél négy spontán abortusz történt. A másik két általunk is észlelt kiegyensúlyozott reciprok transzlokáció - 46,XY,t(2;5)(p13;q21), 46,XY,t(7;20)(p15;p13) – már ismert az irodalomban, de a közölt esetekben az érintett kromoszóma töréspontok eltérőek voltak (Morel és mtsai, 2004; Perrin és mtsai, 2010). A Robertson transzlokációk közül férfi infertilitás okaként leggyakrabban a 13-as és 14-es kromoszómák közötti Robertson transzlokációt említik (Nagvenkar és mtsai, 2005). Az általunk vizsgált három Robertson transzlokáció is 45,XY,rob(13;14)mat kariotípusnak felelt meg. Mindhárom infertilis férfi az anyjától örökölte a kromoszóma eltérést.

A kromoszómák inverziójának előfordulási gyakorisága irodalmi adatok szerint 0,8‰ az átlag populációban (Kalz és Schwanitz, 2004). A 9-es kromoszóma centromerikus heterokromatinjának pericentrikus inverziója a kromoszóma polimorfizmusok közé sorolható, azonban felvetődött a férfi fertilitásban játszott szerepe (Foresta és mtsai, 2002). Az egyik tanulmány szerint a pericentrikus inverzióval rendelkező személyek 20%-ánál sterilitási

problémák jelentkeznek, míg a normális kariotípusú szülők esetében a sterilitási gondokat szignifikánsan ritkábbnak találták (6%) (Bhasin, 2005). Más szerzők a kromoszómák heterokromatinjának inverzióját azoospermiás betegekben gyakrabban mutatták ki, mint az átlag populációban (Pienna Videau és mtsai, 2001; Liehr és mtsai, 2003; Cortés-Gutiérrez és mtsai, 2004). A 9-es kromoszóma inverzió a meiotikus kromoszóma szegregáció során megnövekedett számú diploid spermium kialakulását okozhatja. Az inverzió spermatogenezisre kifejtett hatása a spermiumok morfológiájának, mozgékonyságának és a meiotikus szegregáció módosításának tulajdonítható (Collodel és mtsai, 2006). Munkánk során férfi infertilitásban két esetben (2/305 férfi) találtunk 9-es kromoszóma pericentrikus inverziót, ami magasabb az átlag populációban talált inverzió előfordulási gyakoriságnál (0,66%).

5.2. Kromoszóma szintű eltérések női infertilitásban

Női infertilitásban a kromoszóma eltérések gyakorisága 5%-ra tehető, melyek a nemi kromoszómákat 2,8%-ban, míg az autoszómákat 2,1%-ban érintik (van der Ven és mtsai, 1998; Gekas és mtsai, 2001; Foresta és mtsai, 2002). Az általunk vizsgált nőbetegek között az egyik leggyakoribb kromoszóma eltérés az X kromoszóma számbeli eltérése volt mozaikos formában ($n=7$, 3,6%), egy esetben Robertson-transzlokációt (0,5%) és hét esetben (3,6%) a 9-es kromoszóma pericentrikus inverzióját mutattuk ki.

A leggyakoribb kromoszóma eltérés infertilis nőkben a Turner-szindróma. A primer amenorrhoea 30%-át Turner-szindróma okozza (Hjerrild és mtsai, 2008). Az újszülött lányokban a szindróma incidenciája 1:2000 és 1:2500 között változik. Az igen magas intrauterin mortalitás miatt a prenatális prevalencia jóval magasabb a posztnatálisnál. A legtöbb esetet felnőttkorban (38%) és tizenéves korban (26%) diagnosztizálják, míg születéskor az esetek csak 15%-a kerül felismerésre. A többi eset diagnosztizálatlan marad. A Turner-szindrómára jellemző az alacsony testmagasság, a gonád diszgenezis, az elégtelen női

nemi hormon produkció (FSH, LH) miatt az ovárium elégtelenség és az infertilitás (Gravholt, 2004; 2005; Hjerrild és mtsai, 2008). A Turner-szindróma hátterében álló leggyakoribb kromoszóma eltérések a következők: X-monoszómia – 45,X; mozaicizmus (50-75%) – amely magában foglalja a 45,X/46,XX (10-15%), 45,X/46,XY (2-6%), 45X/46,X,i(Xq), 45,X/46,X,del(Xp), 45,X/46,XX/47,XXX kariotípusokat; strukturális X kromoszóma eltérések – teljes, vagy részleges X kromoszóma rövidkar deléció: 46,X,del(Xp), X kromoszóma hosszúkar izokromoszóma: 46,X,i(Xq), ring X kromoszóma: 46,X,r(X), marker kromoszóma: 46,X+m. Az X kromoszómán található gének (*SHOX*, *ODG2*, *VSPA*, *SOX3*) genetikai eltérései magyarázzák a fenotípus kialakulását. A *SHOX* (short stature homeobox) gén haploinsufficienciája okozza az alacsonynövést, a csontok morfológiájának eltéréseit és a cubitus valgust (Hjerrild és mtsai, 2008).

Az általunk talált hét beteg mindegyike mozaik Turner-szindrómás volt, a sejtek 93%-ában két, 4,5%-ában egy és 2,5%-ában három X kromoszómát igazoltunk. A sejtek kis százalékában plusz X kromoszóma is jelen volt, mely az ilyen kariotípus esetén gyakori. A tripla X szindróma a nők körülbelül 0,1%-ánál fordul elő és 47 kromoszómát eredményez (Afshan, 2012). Lehet apai és anyai eredetű. Az anyai eredetű változat életkor specifikus (az életkor előrehaladtával a valószínűsége nő) (Kodandapani és mtsai, 2011). Az X kromoszómák növekedésével nem fokozódik a nőies jelleg, hanem éppen ellenkezőleg, csökken. A tripla X szindrómában szenvedő nők többsége az átlagosnál magasabb, jellegzetes fizikai eltérést azonban nem fedezhetünk fel. A női nemi szervek lehetnek szabályosak vagy gyengén fejlettek. Jellemző a cikluszavar, vagy a korai menopauza. A betegek 75%-a fogamzóképes (fertilis). A tripla X-szindrómában szenvedőknél gyakoribbak a tanulási nehézségek, elsősorban a beszéd és az írott szövegértés nehézségei. A motorikus készségek (például ülés, járás) késleltetett fejlődése, a gyengébb izomtónus, viselkedési problémák és érzelmi labilitás szintén a tünet együttes velejárói lehetnek. Az érintett nők mintegy 10%-ánál

figyelhető meg vese-rendellenesség. Ugyanakkor mindezen tünetek igen széles skálán mozognak és nagy egyedi eltérések lehetségesek (Goldschmidt és mtsai, 2010).

Az autoszómák kiegyensúlyozott reciprok és Robertson transzlokációi női infertilitásban is szerepet játszanak. Az autoszomális transzlokációk gyakoriságát női infertilitásban 0,5% alattinak becsülik (Foresta és mtsai, 2002). Az autoszóma rendellenességek abban az esetben vezetnek infertilitás kialakulásához, ha az átrendeződésben érintett régiók szerepet játszanak a nemi fejlődésben, valamint a crossing over során a rendellenes homológ kromoszóma párok interkromoszómális hatás révén a többi kromoszóma aneuploidiáját okozzák (Kaur és mtsai, 2004; Mikelsaar és mtsai, 2006). Laboratóriumunkban egy esetben a 14-es és a 21-es kromoszómák közötti Robertson-transzlokációt mutattunk ki. Infertilitásban férfiakhoz hasonlóan a nőket is leggyakrabban a 13-as, 14-es és 21-es kromoszómák Robertson-transzlokációja érinti. A 45,XX,der(13;14) és 45,XX,der(14;21) transzlokációt hordozó nők összehasonlítása során azt találták, hogy mindkét típusnál szignifikánsan gyakoribbak voltak a normális kariotípusú oocyták, mint a kiegyensúlyozott kromoszóma készlettel bíró sejtek, míg a kiegyensúlyozatlan kromoszóma készletű petesejtek száma emelkedettnek bizonyult 45,XX,der(14;21) kariotípus esetén (Munné és mtsai, 2000).

A kromoszómák inverziójának populációs előfordulási gyakorisága irodalmi adatok szerint 0,8‰, míg a 9-es kromoszóma heterokromatin pericentrikus inverziójáé ennek kétszerese (Kalz és Schwanitz, 2004). Nőkben az inverzió a meiotikus kromoszóma szegregáció során diploid oocyta kialakulását okozhatja. A fenotípusban eltérést nem okoz, inkább csökkent fertilizációs képességgel hozzák összefüggésbe (szubfertilitás), mint az infertilitással (Bhasin, 2005). Munkánk során női infertilitás genetikai kivizsgálása során hét esetben (3,6%) találtunk 9-es kromoszóma pericentrikus inverziót, ami magasabb az átlag populációban talált inverzió előfordulási gyakoriságnál.

5.3. Az Y kromoszóma AZF régiójának deléciói

Vizsgáltuk az infertilitás szempontjából jelentős Y kromoszóma mikrodeléciókat különböző spermium koncentrációjú férfiak esetében. Tanulmányoztuk továbbá az AZFc régióban fellépő parciális mikrodeléciók előfordulását, hogy adatokat gyűjtsünk a magyar populációra jellemző előfordulási gyakoriságukról.

Az AZFb és AZFc régiókat érintő 6,2-7,7 Mb-os deléciók csak az azoospermiás és a súlyos oligozoospermiás esetekben fordultak elő, míg a normozoospermiás férfiakban és a bizonyítottan fertilis csoportban nem. Az azoospermiások között szignifikánsan gyakoribb az AZFc deléció előfordulása a többi csoporthoz képest. A b1/b3 parciális deléciót csak egy azoospermiás esetben tudtuk kimutatni. A gr/gr deléció azoospermiásokban nem fordult elő, míg oligozoospermiás és normozoospermiás férfiakban igen, előfordulási gyakoriságukban nem volt szignifikáns különbség. A b2/b3 deléció gyakoriságában sem észleltünk szignifikáns különbséget az egyes csoportok között. A bizonyítottan fertilis férfiak esetében Y kromoszóma mikrodeléció nem volt kimutatható.

Az irodalmi adatok szerint klinikailag jelentős számban igazolható Y mikrodeléció az azoospermiás és a $<1 \times 10^6$ /ml spermiumkoncentrációjú (súlyos oligozoospermiás) férfiak esetében. Ritkább a mikrodeléció az $1-5 \times 10^6$ /ml spermiumkoncentrációjú infertilis férfiaknál (Krausz és mtsai, 2000; Simoni és mtsai, 2004). A gr/gr és b2/b3 típusú parciális mikrodeléció előfordul oligozoospermiás és normozoospermiás esetekben is, ami arra utal, hogy ezek a deléciók nincsenek összefüggésben a spermiumképződés zavarával, míg a gr/gr deléció rizikótényezőnek tekinthető. Irodalmi adatokkal összhangban a gr/gr deléciót gyakoribbnak találtuk a b2/b3 deléció előfordulásánál (Giachini és mtsai, 2005).

A gr/gr deléció az AZFc régió génjeinek felét eltávolítja (*DAZ*, *CDY1* és *BPY2* gének). Az ilyen delécióval rendelkező férfiaknak hétszer nagyobb esélyük van oligozoospermia kialakulására, mint a deléció nélkülieknek. Az oligozoospermiások között az előfordulási

gyakoriság 4% körüli (Giachini és mtsai, 2005; Krausz, 2011). A gr/gr deléció előfordulási gyakorisága és a fenotípusos megjelenése a különböző etnikumú férfiakban eltérő, függ az Y kromoszóma haplotípusától (Giachini és mtsai, 2008; Navarro-Costa és mtsai, 2010). A **7. táblázat** összefoglalja a különböző populációkban végzett gr/gr parciális mikrodeléciós tanulmányok eredményeit, összehasonlítva az általunk kapott eredményekkel. Bizonyos populációkban összefüggést találtak a gr/gr deléció megléte és a spermiumtermelésre kifejtett hatása között. A táblázatban a betegek oligozoospermiás férfiak, a kontroll csoport fertilis férfiakból áll, az utolsó oszlopban kontrollként a normozoospermiás férfiak gyakoriságát adtuk meg (Giachini és mtsai, 2008 és Navarro-Costa és mtsai, 2010 alapján). Az általunk vizsgált 86 oligozoospermiás férfi közül háromban gr/gr deléciót, míg a kontroll csoportban (110 normozoospermiás és 22 bizonyítottan fertilis eset) négy gr/gr deléciót (3,03%) mutattunk ki. Nincs szignifikáns különbség a két csoport között, de a deléció a spermium képződési zavar kialakulására utalhat.

	Szerzők	Populáció	Betegek		Kontrollok		
			Összes n	gr/gr %	Összes n	gr/gr %	A kontrollcsoportban a normozoospermiások gyakorisága (%)
Összefüggést találtak	Repping és mtsai, 2003	holland	246	3,7	148	0	100
	de Llanos és mtsai, 2005	spanyol	283	4,2	232	0	14,6
	Ferlin és mtsai, 2005	olasz	337	4,7	263	0,4	100
	Giachini és mtsai, 2005	olasz	150	5,3	189	0,5	100
	Lynch és mtsai, 2005	ausztrál	1351	4,1	234	0,4	57,3
	Navarro-Costa és mtsai, 2007	portugál	300	5,3	300	1	0
	Yang és mtsai, 2008	kínai	414	10,6	262	5,3	100
Összefüggést nem találtak	Machev és mtsai, 2004	francia	300	6	399	3,5	1
	Hucklenbroich és mtsai, 2005	német	348	4	170	1,8	100
	de Carvalho és mtsai, 2006	japán	78	28,2	56	33,9	0
	Zhang és mtsai, 2006	É-ázsiai	87	10,3	89	10,1	100
	Wu és mtsai, 2007	kínai	439	7	248	7,7	34,6
	Lardone és mtsai, 2007	chilei	95	2,1	77	2,6	40,2
	Stouffs és mtsai, 2008	kaukázusi	187	4,3	394	3	70,5
	Saját tanulmány, 2011	magyar	86	3,49	132	3,03	100

7. táblázat. Különböző populációkban végzett gr/gr parciális mikrodéléciós tanulmányok (Giachini és mtsai, 2008 és Navarro-Costa és mtsai, 2010 alapján). A táblázat utolsó oszlopában a kontroll populáció normozoospermiás férfiainak gyakoriságát adtuk meg. Saját vizsgálataink eredményei is az oligozoospermiás férfiakra vonatkoznak.

AZFc deléció esetén mód van sikeres asszisztált reprodukcióra, de ennek során a genetikai eltérés minden fenotípusos következményével átöröklődik a fiú utódba (Simoni és mtsai, 2004). Az AZFc deléciós Y kromoszóma a meiosis során elvész, ezért az AZFc deléciót hordozó férfiak hímivarsejtjeinek nagy része nulliszóm a nemi kromoszómára nézve. Az utódban gyakoribb lehet a nemi kromoszómák aneuploidiaja, mozaicizmusa és jelentős a kockázat Turner-szindróma kialakulására (Patsalis és mtsai, 2002). Irodalmi adatok alapján eddig 17 fiú és 18 lány született ICSI után Y mikrodeléciót hordozó apától. A gyermekek fenotípusos eltérést nem mutattak, nem volt eltérés a külső nemi szerveik tekintetében és egy esetben sem fordult elő Turner-szindróma, valószínűleg azért, mert a 45,X kariotípusú embriót hordozó terhességek jelentős része spontán abortusszal végződik (Oates és mtsai, 2002; Simoni és mtsai, 2004). Mindezek miatt az Y mikrodeléciót hordozó férfiak partnereinél fokozott spontán abortusz kockázattal kell számolni. Megfigyeléseink mellett szólnak, hogy azon azoospermiás és súlyos oligozoospermiás férfiak esetében, akiknél ICSI-re vagy TESE/ICSI-re kerül sor, ajánlott az Y mikrodeléciós vizsgálat elvégzése. Ugyanakkor a TESE elvégzése indokolatlan AZFa, AZFb és AZFb+c deléció esetén (Simoni és mtsai, 2004). Az Y kromoszóma deléciőt hordozó férfiak számára fontos a genetikai tanácsadás. Az Y kromoszóma mikrodeléciót hordozó infertilis férfiak esetében ICSI után preimplantációs genetikai diagnosztika javasolt a Turner-szindrómás utód születésének megelőzésére. Ezen túlmenően ajánlott ICSI után az Y mikrodeléciós apától született gyermekek genetikai vizsgálata lányok Turner szindrómájának felismerésére, valamint a fiúk infertilitása hátterében álló genetikai okok tisztázása céljából (Patsalis és mtsai, 2002).

5.4. Spermiumok hialuronsav-kötő képessége

A spermiumsejtek érésében egy chaperone protein, a HspA2 játszik szerepet a spermiogenezis utolsó lépéseinél. A HspA2 szintézis második hullámával és a citoplazma kilökődésével párhuzamosan egy érettséggel összefüggő plazmamembrán átrendeződés

(remodeling) megy végbe (Huszar és Vigue, 1993; Dix és mtsai, 1996; Eddy és mtsai, 1999; Huszar és mtsai, 2000; Kovanci és mtsai, 2001). A remodeling szükséges ahhoz, hogy megjelenjenek a spermiumsejtek felszínén a zona pellucida kötőhelyek és a hialuronsav receptorok (Huszar és mtsai, 1997; 2003). Az éretlen, citoplazma retenciót mutató spermiumok kreatin kináz (CK) tartalma magas és HspA2 szintje alacsony, ezek a sejtek képtelenek a zona pellucidához való kötődésre (Huszar és mtsai, 1994). Az érett spermiumok a zona pellucidához hasonlóan a hialuronsavhoz is szelektíven kötődnek (Huszar és mtsai, 2003). A hialuronsav a női genitális traktusban élettani körülmények között is jelen van a cervicalis nyákban és a cumulus oophorusban. A hialuronsav-receptor jelenlétét a spermiumok felszínén több laboratóriumban is igazolták (Kornovski és mtsai, 1994; Ranganathan és mtsai, 1994). Mesterséges körülmények között a frissen ejakulált és a cryoprezervált érett spermiumok is képesek kötődni a hialuronsavhoz, így elválaszthatók egymástól az érett és éretlen spermiumok (Huszar és mtsai, 1990; Sbracia és mtsai, 1997). Mivel az éretlen spermiumok kromoszóma aberrációinak gyakorisága magas, a hialuronsav kötődés hasznos szelekciós eljárás spermiumoknak a szelektálására, amelyek kromoszóma aberrációinak gyakorisága alacsony (Jakab és mtsai, 2005; Huszar és mtsai, 2007).

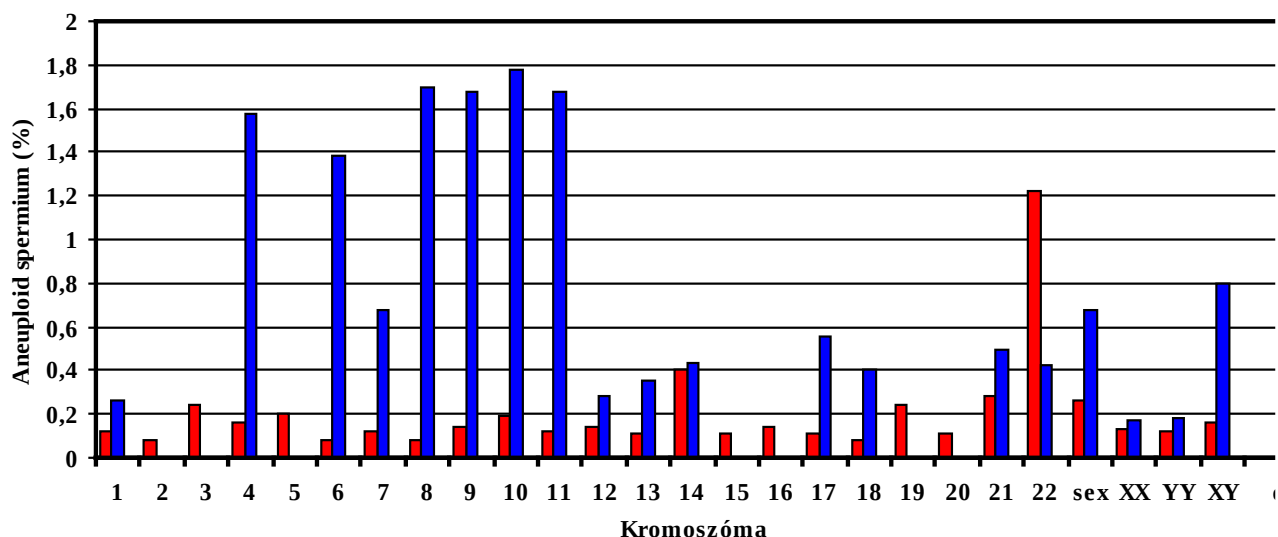
Munkánk során különböző spermium koncentrációjú és mozgású spermiumsejtekkel rendelkező férfiak hialuronsav kötő képességét vizsgáltuk HBA-teszt segítségével. A normozoospermiás csoport hialuronsav-kötődési képessége szignifikánsan magasabb volt, mint az oligozoospermiás, asthenozoospermiás és az oligoasthenozoospermiás férfiaké, mivel a normál mozgású és számú spermiumokkal rendelkező férfiak nagyrészt érett spermiumokkal rendelkeznek, ellentétben a sok éretlen spermiumot tartalmazó oligoasthenozoospermiás férfiakkal. Korábbi tanulmányokkal összhangban saját eredményeink is azt mutatják, hogy a normál, érett spermiumokkal rendelkező férfiak

hialuronsav-kötő képessége 80 % fölött van (Huszar és mtsai, 2007; Yagci és mtsai, 2010; Kovacs és mtsai, 2011).

A HBA-teszt segítségével jó kötődésűnek ítélt infertilis férfiak spontán termékenyítési képessége nem megfelelő. A hialuronsav kötődésen alapuló tesztek nem nyújtanak támpontot az IVF módjának megválasztására (Kovács és mtsai, 2011). A hialuronsav-kötött spermatozoával ICSI során megtermékenyített petesejtből egészséges embrió fejlődik, de a módszer a megtermékenyítés hatékonyságát nem növeli szignifikánsan (Parmegiani és mtsai, 2010).

5.5. A spermiumok kromoszóma aberrációi

A normozoospermiás férfiakat felölölő vizsgálatok összesítése szerint az aneuploid spermiumok gyakorisága mintegy 6,5 %, egyes szerzők szerint akár 15% is lehet (Egozcue és mtsai, 1997; Foresta és mtsai, 2002; Jakab és mtsai, 2003). A meddő férfiak többségének csökkent spermiumkoncentrációjú és mozgású ejakulátumában az éretlen spermiumok aránya és a számbeli kromoszóma rendellenességet hordozó spermiumok előfordulási gyakorisága magasabb (Huszar és mtsai, 1988; Shi és Martin, 2001). A **14. ábrán** irodalmi adatok alapján az egyes testi kromoszómákra és a nemi kromoszómákra kapott spermium aneuploidia gyakoriságokat foglaltuk össze normozoospermiás és spermium paramétereik alapján infertilisnek tekintett férfiak esetében. A 14-es és a G-csoportú kromoszómák (21-es és 22-es) esetében magasabb diszómia frekvenciát igazoltak. A szubmetacentrikus autoszómák (főleg a 4-es és a C-csoportú (6-11) kromoszómák) aneuploidiaja emelkedett infertilis férfiak spermiumainak esetében, mivel ezek triploidiaja magzati vetélésnek jelentkezik. Az összesített aneuploidia frekvencia szintén magasabb meddő férfiak esetében (Downie és mtsai, 1997; Egozcue és mtsai, 1997; Shi és Martin, 2000; 2001; Hristova és mtsai, 2002).



14. ábra. Az autoszómák és a nemi kromoszómák spermium aneuploidia gyakorisága normozoospermias és infertilis férfiak esetében (Downie és mtsai, 1997; Egozcue és mtsai, 1997; Shi és Martin, 2000; 2001; Horistova és mtsai, 2002 alapján). A szubmetacentrikus autoszómák aneuploidiaja és az összesített aneuploidia emelkedett infertilis férfiak spermiumainak esetében.

■ normozoospermias férfiak aneuploidia gyakorisága, ■ infertilis férfiak aneuploidia gyakorisága

Szoros egyenes összefüggést igazoltak egyes munkacsoportok az éretlen spermiumok aránya és az aneuploid spermiumok gyakorisága és fordított korrelációt a spermiumkoncentráció és a spermiuméretlenség között (Huszar és Vigue, 1993; Huszar és mtsai, 2000; Kovanci és mtsai, 2001). Vizsgálataink során ugyanezt az összefüggést igazoltuk, amikor a vizsgált férfiak spermium mintáinak becsült számbeli kromoszóma aberrációját határoztuk meg a nemi kromoszómák és egy autoszóma (17-es kromoszóma) diszómia frekvenciájának ismeretében. A **14. ábrából** is látható, hogy a 17-es kromoszóma aneuploidia frekvenciája az összes autoszóma aneuploidia átlagával megegyezik (0,12 %), így vizsgálata elfogadott a spermiumok becsült számbeli kromoszóma aberrációinak meghatározására. Munkánk során 45 különböző spermiumparaméterekkel rendelkező férfi spermiumának kromoszóma aberrációi gyakoriságát tanulmányoztuk. A nemi kromoszómák és a 17-es kromoszóma diszómia és a teljes diploidia frekvencia szignifikánsan magasabb volt

az oligoasthenozoospermiás csoportban a másik három csoporttal összehasonlítva. Szignifikáns különbséget találtunk továbbá a becsült számbeli kromoszóma aberráció gyakorisága tekintetében az oligoasthenozoospermiás és a normozoospermiás, az oligoasthenozoospermiás és az oligozoospermiás illetve az oligoasthenozoospermiás és az asthenozoospermiás csoportok között.

A kromoszóma eltérések, leggyakrabban a nemi kromoszóma aneuploidiák gyakoribbak ICSI terhességekből született gyermekeknél (Bonduelle és mtsai, 1998). Az étellel összeegyeztethető genetikai eltérések (Klinefelter-szindróma) az esetek jelentős részében infertilitással társulnak, ICSI segítségével viszont sikeres lehet a gyermeknemzés. Ilyenkor azonban a kromoszóma eltérés továbbörökítésének kockázata igen magas. Az asszisztált reprodukciós beavatkozások után jelentkező magas sikertelenségi és magas vetélési arányért jelentős mértékben felelősek az apai részről átadott kromoszóma-rendellenességek (Bonduelle és mtsai, 2002).

Az aneuploid gaméták emelkedett gyakorisága esetén a betegek többségénél nem észlelhető szomatikus kromoszóma eltérés. A számbeli kromoszóma eltérést hordozó spermiummal történő fertilizáció esetén az eseteknek csak kis hányada jelenik meg az újszülöttekben, többségük magzati veszteséggént jelentkezik. A koraterhességi vetélések jelentős részéért magzati aneuploidia felelős, leggyakrabban a 16-os kromoszóma triszómiája (Eiben és mtsai, 1990). Ismétlődő vetélések kapcsán FISH módszerrel végzett spermiumvizsgálatokkal oligozoospermia esetén a 15-ös, a 18-as és a nemi kromoszómák diszómiájának, és a nemi kromoszómák nulliszómiájának emelkedett frekvenciáját igazolták (Giorlandino és mtsai, 1998; Rubio és mtsai, 1999). FISH vizsgálati adatok szerint a spermiumon kimutatható aneuploidia gyakoriság bármely kromoszómára vonatkozóan jóval magasabb az epidemiológiai magzati triszómia gyakoriságánál. Kivételt képez az 47,XXY és az 47,XYY triszómia, mivel az ilyen kariotípusú magzatok életképesek. Az ICSI segítségével

fogant terhességekből született gyermekek között a rendellenes kariotípus előfordulása négyszer gyakoribb (0,8%) (In't Veld és mtsai, 1995; 1997; Bonduelle és mtsai, 1998). A triploidia gyakori oka a koraterhességi veszteségeknek, a spontán vetélések 12-13%-ában fordul elő (Eiben és mtsai, 1990). Apai eredetű magzati triploidióval kapcsolatos konkrét adatok ismételt vetélések miatt spermiumokon végzett kromoszóma vizsgálatokból állnak rendelkezésre. Ezek az adatok a habituális vetéléseket okozó triploidiók jelentős részében paternális eredetre utalnak (Aran és mtsai, 1999; Rubio és mtsai, 1999; Egozcue és mtsai, 2000; Zaragoza és mtsai, 2000).

5.6. Összefüggés a spermium koncentráció, a hialuronsav-kötődési képesség és a becsült számbeli kromoszóma aberráció gyakoriság között

Jóllehet az éretlen spermiumok aránya a férfiak ivarszerveiben különböző, amikor egy férfi spermiumszáma magas, az érett spermiumok is gyakoribbak az ejakulátumban (Kovanci és mtsai, 2001; Celik-Ozenci és mtsai, 2004). Csökkent spermiumkoncentrációjú férfiak spermiumaiban gyakoriak az aneuploidiók (Shi és Martin, 2001).

A spermiumok éretlensége és az aneuploidiója közötti kapcsolatot a HspA2 fehérje funkciója kapcsán érthetjük meg. A HspA2 egy chaperon, melynek expressziója két hullámban történik a spermatogenezis és a spermiogenezis során (Huszar és mtsai, 2000). Először a primer és szekunder spermatocitában jelenik meg a szinaptonemális komplex összetevőjeként a homológ kromoszómák között a meiózis alatt. Az expresszió második hulláma a spermiogenezis végén történik, a citoplazma kilökődésével, a plazma membrán átrendeződésével, a zona pellucida kötőhelyek és a hialuronsav receptorok kialakulásával párhuzamosan. Mivel a fehérje a szinaptonemális komplex összetevője (Dix és mtsai, 1996; Eddy és mtsai, 1999), csökkent expressziója a meiózis hibájához, aneuploidióhoz, kromoszóma aberrációkhoz vezet. A citoplazma retencióval jellemezhető éretlen spermiumok HspA2 szintje szintén alacsony (Kovanci és mtsai, 2001).

Szignifikáns összefüggést találtak ($r=0,7$) a citoplazma retenciával rendelkező éretlen spermiumok aránya és a spermiumok aneuploidia frekvenciája között, arra utalva, hogy az aneuploidia éretlen és csökkent HspA2 szinttel rendelkező spermium sejtekre jellemző (Kovanci és mtsai, 2001). A zona pellucida kötőhelyek és a spermiumérettség közötti összefüggést is korábban igazolták: csak az érett spermiumok képesek a zona pellucida kötésére (Huszar és mtsai, 1994). Az érett spermiumok hialuronsav-kötő receptorról rendelkeznek, szelektíven kötődnek a hialuronsavhoz a zona pellucida kötéshez hasonlóan. A hialuronsav-receptor, a zona pellucida kötőhelyekhez hasonlóan az éretlen és alacsony HspA2 szinttel rendelkező sejtek felszínén nem található meg (Huszar és mtsai, 1997; 2003). Korábban igazolták, hogy a hialuronsav-kötött sejtek kromoszóma aneuploidiainak gyakorisága alacsony (Jakab és mtsai, 2005).

Munkánk során szignifikánsan magasabb 17-es és nemi kromoszóma diszómia, diploidia és becsült számbeli kromoszóma aberráció gyakoriságot mutattunk ki a kóros spermium paraméterekkel rendelkező infertilis férfiakban, mint a normozoospermiás kontrollokban. Eredményeink alátámasztják azt a megfigyelést, miszerint a súlyos oligozoospermiás férfiak spermiumaiban gyakoribbak az aneuploidia, mint a normozoospermiások ivarsejtjeiben (Bernardini és mtsai, 1997; 1998; In't Veld és mtsai, 1997; Storeng és mtsai, 1998; Pang és mtsai, 1999; Rives és mtsai, 1999; Zeyneloglu és mtsai, 2000; Calogero és mtsai, 2001). A diszómia gyakoriság infertilis férfiakban összefüggésbe hozható az oligozoospermia súlyosságával (Rives és mtsai, 1999). Az általunk vizsgált normozoospermiás férfiak hialuronsav kötő képessége is szignifikánsan magasabb volt, mint az infertilis férfiaké. Összefüggést igazoltunk a spermium koncentráció, hialuronsav kötődés és a spermiumok kromoszóma aberrációi között (**10. ábra**).

Az ICSI eljárások során, amikor a zona pellucida szelekciós gátja nem működik, éretlen, aneuploid spermiummal is történhet megtermékenyítés. A természetes körülmények

között történő megtermékenyítéshez hasonlóan a hialuronsav-szelektált, érett spermiumokkal a fertilizációs ráta jelentős mértékben javítható, a genetikai komplikációk előfordulása csökkenthető (Jakab és mtsai, 2005; Huszar és mtsai, 2007).

5.7. Kiegyensúlyozott transzlokációt hordozó infertilis férfiak spermium sejtjeinek szegregációs analízise

A kiegyensúlyozott reciprok transzlokáció a leggyakoribb strukturális kromoszóma elváltozás, melynek újszülöttkori incidenciája 1:1175, a kiegyensúlyozott Robertson-transzlokáció incidenciája 1:1085 (De Braekeleer és Dao, 1991; Morel és mtsai, 2004). A transzlokáció hordozók jelentős arányban képeznek kiegyensúlyozatlan kromoszóma készletű gamétákat, melyek vetélésekhez, infertilitáshoz vezetnek. Ha kiegyensúlyozatlan kromoszóma készletű spermatozoa egy normál petesejtet termékenyít meg, a magzat elvetél, ritkán azonban megszülethet, súlyos malformációkkal és mentális retardációval (Morel és mtsai, 2004).

A spermium képződés során a meiózis I osztódásában kvadrivalens (Robertson transzlokáció esetén trivalens) képződik a transzlokált kromoszóma és a normál homológja között. Az alternate szegregáció esetén a transzlokált kromoszóma az egyik spermatocita II-be, míg normál homológja a másik spermatocita II-be transzlokálódik, normál és kiegyensúlyozott hordozó magzatot eredményezve (Morel és mtsai, 2004; Perrin és mtsai, 2010).

A többi szegregációs mód kiegyensúlyozatlan kromoszóma készletet eredményez. Az adjacent szegregációk nullizómiát és diszómiát eredményeznek a spermatozoában és monoszómiát, vagy triszómiát az embrióban. A 3:1 típusú szegregáció során 22 és 24, míg a 4:0 szegregáció során 21 és 25 kromoszómát tartalmazó gaméták keletkeznek (a Robertson-transzlokáció 3:0 szegregációja 21 és 24 kromoszóma tartalmú gamétát eredményez) (Morel és mtsai, 2004; Perrin és mtsai, 2010).

A kiegyensúlyozott reciprok transzlokációt hordozó férfiak esetében a kiegyensúlyozatlan kromoszóma készletű spermatozoák aránya 19-80% között változhat. Ez az arány függ az érintett kromoszómák méretétől, a centromera és a töréspont helyzetétől (Morel és mtsai, 2004). A Robertson-transzlokáció esetén a kiegyensúlyozatlan sejtek aránya csak 2,7-26,5% között változhat (Syme és Martin, 1992; Morel és mtsai, 2004), mivel a meiosis során a trivalens cisz konfigurációja az alternate szegregációnak kedvez, normál és kiegyensúlyozott gamétákat eredményezve (Luciani és mtsai, 1984; Morel és mtsai, 2004).

A FISH elterjedésével nagyszámú ivarsejten (spermiumon) vált lehetővé a transzlokációban érintett kromoszómák szegregációs mintázatának tanulmányozása (Guttenbach és Schmid, 1990). A vizsgálat során a transzlokációban érintett kromoszómák centromeráját és legalább az egyik telomerát jelöljük. A lehetséges interkromoszómális hatás (ICE) kimutatására a transzlokációban nem érintett kromoszómákat vizsgáljuk.

Az általunk vizsgált 46,XY,t(3;6)(q21;q23) kariotípusú infertilis férfi esetében a spermiumok 53,2%-ában kiegyensúlyozatlan kromoszóma készlet volt kimutatható. Ez az igen magas arány meghatározza az asszisztált reprodukció válaszható módszerét, felveti donor spermium használatának szükségességét. Eredményeink összhangban vannak azon más tanulmányok eredményeivel, ahol szintén a 3-as és 6-os kromoszómákat érintette a transzlokáció, bár a töréspontok különbözőek voltak. Számos tanulmány hasonló (Rousseaux és mtsai, 1995; Martini és mtsai, 1998; Lim és mtsai, 2003; Perrin és mtsai, 2010), míg néhány eltérő (Honda és mtsai, 1999; Escudero és mtsai, 2003) szegregációs mintázatról számol be.

Az ICE-t a 17-es és a nemi kromoszómák aneuploidia meghatározása révén igazoltuk: a 17-es kromoszóma diszómia és a diploidia nagyobb gyakorisága a kontroll csoportokhoz képest ezt a hatást igazolja. Az ICE révén a transzlokációban érintett kromoszómák ugyanis befolyásolják a többi kromoszóma meiotikus rekombinációját (Lejuene, 1963; Egozcue és

mtsai, 2000). Több tanulmány igazolta ezt a mechanizmust a 3-as és 6-os kromoszómákat érintő transzlokációk kapcsán (Rousseaux és mtsai, 1995; Blanco és mtsai, 2000; Oliver-Bonet és mtsai, 2002), míg egy másik tanulmányban ez nem volt kimutatható (Estop és mtsai, 2000). A kiegyensúlyozott reciprok transzlokáció hordozók esetében az ICE aneuploid embriót eredményezhet (Gianaroli és mtsai, 2002).

A kiegyensúlyozott transzlokáció hordozók spermiumainak meiotikus szegregációs analízise és a spermiumok X, Y és 17-es kromoszóma aneuploidia analízise a kiegyensúlyozatlan gaméták arányának meghatározása révén egyedi kockázat becslésre, reprodukív prognózis megállapítására ad lehetőséget. IVF esetén pre-implantációs genetikai diagnosztika indokolt azoknak a pároknak, akik egyikében kiegyensúlyozott transzlokáció igazolódott (Escudero és mtsai, 2003; Morel és mtsai, 2004).

5.8. Az *FMR1* gén tiplextanziója korai ovárium elégtelenségben

A korai ovárium elégtelenség (POF) jellemzője a 40 éves kor előtt megjelenő amenorrhoea (több mint hat hónapja) magas FSH (>20 IU/l) és LH szinttel (Vegetti és mtsai, 2000; Shelling, 2010). Számos gén lehet felelős a POF kialakulásáért, főleg azok amelyek a hipotalamusz-hipofízis-ovárium tengely szabályozásában vesznek részt (Foresta és mtsai, 2002; Laml és mtsai, 2002; Dixit és mtsai, 2010). Az X kromoszóma hosszúkar (Xq) deléciója vagy transzlokációja összefüggésben van a POF kialakulásával az ovárium funkcióját befolyásoló gének deléciója illetve funkciókiesése révén (Powell és mtsai, 1994; Dixit és mtsai, 2010). A POF 33%-ban családi halmozódást mutat, a többi eset sporadikus (Coulam és mtsai, 1986; Vegetti és mtsai, 1998; 2000).

A leggyakrabban vizsgált gén POF esetében az Xq27.3 régióba lokalizálódó *FMR1* gén (Foresta, 2002; Laml és mtsai, 2002; ESHRE Capri Workshop Group, 2004; Tassone és mtsai, 2008). A tünetek kialakulásáért a gén premutációja felelős: sporadikus esetekben 1,6%, míg familiáris halmozódásnál 16%-ban lehet az *FMR1* gén premutációjára számítani

(Allingham-Hawkins és mtsai, 1999; Laml és mtsai, 2002; Tassone és mtsai, 2008; Dixit és mtsai, 2010). Más tanulmányok szerint az összesített előfordulási gyakoriság 6% (Marozzi és mtsai, 2000; Dixit és mtsai, 2010). Az *FMR1* premutációt hordozó nők 15-25%-a korai ovárium elégtelenségben szenved (Laml és mtsai, 2002; Tassone és mtsai, 2008). Az *FMR1* premutáció okozta POF az esetek nagyobb arányában apai eredetű (28%), míg az anyai eredetű premutációt csak 3,7%-ban igazolták (Hundscheid és mtsai, 2000).

Vizsgálatainkban tizenhét sporadikus amenorrhoeás korai ovárium elégtelenségben szenvedő nő közül két esetben igazoltuk az *FMR1* gén premutációját (11,8%). Az egyikben mozaikos formában, a másikban az összes szomatikus sejtben jelen volt a premutáns allél. Mindkét betegben igazolható volt az *FMR1* premutáció szerepe az amenorrhoeás tünetek kialakulásában (Foresta, 2002; Laml és mtsai, 2002; Tassone és mtsai, 2008; Dixit és mtsai, 2010; Shelling, 2010).

5.9. Legfontosabb megállapításaim

1. *Férfi infertilitás* háttérében a legtöbb esetben Klinefelter szindróma, vagy a nemi kromoszómák egyéb szám-, vagy szerkezetbeli eltérése állt (3,9 %), míg az autoszómákat érintő citogenetikai eltérések gyakorisága 2% volt. Ugyanezen csoportban a 9-es kromoszóma pericentrikus inverzióját gyakoribbnak találtuk az átlag populációhoz képest.

2. *Női infertilitásban* a leggyakoribb kromoszóma eltérés az X kromoszóma számbeli eltérése volt mozaikos formában, egy esetben Robertson-transzlokációt és hét esetben a 9-es kromoszóma pericentrikus inverzióját mutattuk ki.

3. Az AZFb és AZFc régiókat érintő deléciók *csak az azoospermiás és a súlyos oligozoospermiás* esetekben fordultak elő, míg a normozoospermiás férfiakban és a bizonyítottan fertilis csoportban nem. Az azoospermiások között szignifikánsan gyakoribb az AZFc deléció előfordulása a többi csoporthoz képest.

4. A *gr/gr* és *b2/b3* típusú *parciális mikrodeléción* előfordul oligozoospermiás és normozoospermiás esetekben is, ami arra utal, hogy *ezek a deléciók nincsenek összefüggésben a spermiumképződés zavarával*, míg a *gr/gr deléción rizikótényezőnek* tekinthető.

5. A *normozoospermiás csoport hialuronsav-kötődési képessége szignifikánsan magasabb volt, mint az oligozoospermiás, asthenozoospermiás és az oligoasthenozoospermiás férfiaké*, mivel a normál mozgású és számú spermiumokkal rendelkező férfiak nagyrészt érett spermiumokkal rendelkeznek, ellentétben a sok éretlen spermiumot tartalmazó oligoasthenozoospermiás férfiakkal.

6. A spermiumok *nemi kromoszóma és 17-es kromoszóma diszómia*, valamint a *diploidia* frekvenciája szignifikánsan magasabb volt a kóros spermium paraméterekkel rendelkező infertilis férfiakban, mint a normozoospermiás kontrollokban.

7. *Összefüggést igazoltunk a spermium koncentráció, hialuronsav kötődés és a spermiumok kromoszóma aberrációi között.*

8. Az általunk vizsgált *46,XY,t(3;6)(q21;q23)* kariotípusú infertilis férfi esetében *a spermiumok 53,2%-ban kiegyensúlyozatlan kromoszóma készlet* volt kimutatható. Ez az igen magas arány meghatározza az asszisztált reprodukció válaszható módszerét, felveti donor spermium használatának szükségességét.

9. Az *interkromoszómális hatást* (ICE) a 17-es és a nemi kromoszómák aneuploidia meghatározása révén igazoltuk: a *t(3;6)* hordozó férfi esetében észlelt 17-es kromoszóma diszómia és a diploidia nagyobb gyakorisága a kontroll csoportokhoz képest ezt a hatást igazolja.

10. Tizenhét sporadikus amenorrhoeás korai ovárium elégtelenségben szenvedő nő közül két esetben igazoltuk az *FMR1* gén premutációját. Mindkét betegben igazolható volt az *FMR1* premutáció szerepe az amenorrhoeás tünetek kialakulásában.

6. ÖSSZEFOGLALÁS

A fejlett országokban az infertilitás gyakorisága 10-15%-ra tehető, az esetek felének háttérében genetikai eltérés állhat. A genetikai vizsgálat első lépése a hagyományos kromoszóma analízis, melyet a tünetek függvényében célzott molekuláris genetikai vizsgálatok követnek. Laboratóriumunkban 500 infertilis esetében került sor citogenetikai, 17-ben *FMR1* gén, 150-ben Y kromoszóma mikrodeléció, 28-ban a spermiumok számbeli kromoszóma aberrációinak vizsgálatára és egy kiegyensúlyozott transzlokációt hordozó férfinél a spermium kromoszómák szegregációjának tanulmányozására. A nők között a leggyakoribb kromoszóma eltérés az X kromoszóma számbeli eltérése és a 9-es kromoszóma inverziója (3,6%) volt, két további esetben az *FMR1* gén tripletexpánzióját mutattuk ki. Infertilis férfiakban a Klinefelter szindróma (3,3%) és az autoszómákat érintő transzlokációk igazolódtak leggyakrabban az infertilitás háttérében (2%). Y kromoszóma mikrodeléciók csak az azoospermiás és a súlyos oligozoospermiás esetekben fordultak elő, míg parciális mikrodeléciót normozoospermiásokban is észleltünk. Gyakrabban észleltünk kromoszóma aberrációt a spermiumokban, amikor a spermiumok száma és mozgása egyaránt rendellenes volt. Egy 46,XY,t(3;6)(q21;q23) kariotípusú férfi esetében a spermiumok 53,2%-a hordozott kiegyensúlyozatlan kromoszóma készletet. Az infertilitás esetén, ha egyéb organikus és funkcionális ok nem merül fel, megfelelő indikáció - csökkent spermiumszám, habituális vetélések, ill. korai menopauza - alapján genetikai vizsgálat végzése indokolt. Ha genetikai eltérés igazolódik, az jelzi az utód genetikai kockázatát és rámutat az asszisztált reprodukció leghatékonyabb módjára. Az embrió és a magzat pontos genetikai eltérését azonban csak a preimplantációs és a prenatális genetikai diagnosztika segítségével állapíthatjuk meg. Sajnos, nem minden esetben sikerül az infertilitás háttérében álló ok, az etiológia tisztázása. Így az asszisztált reprodukció sikeressége csak valószínűsíthető.

SUMMARY

In the western countries infertility affects about 10-15% of couples, genetic factors can be identified in about half of the cases. The first step of the genetic diagnosis is the conventional chromosome analysis, followed by molecular genetic tests according to the specific symptoms. In our laboratory we carried out cytogenetic analysis in 500, *FMR1* gene analysis in 17, Y chromosome microdeletion analysis in 150, determination of sperm numerical chromosome aberration in 28 cases and sperm meiotic segregation study in one balanced reciprocal translocation carrier. In female infertility the most common chromosome aberrations were the numerical aberration of chromosome X and inversion of chromosome 9 (3.6%). In two cases *FMR1* gene triplet expansion was found. In male infertility the most frequent cytogenetic aberration proved to be the Klinefelter syndrome (3.3%) and autosomal translocations (2%). Y chromosome microdeletions were identified only in azoospermic and severe oligozoospermic men, but partial microdeletions could also be detected in normozoospermic men. When sperm concentration and motility were damaged simultaneously, we found a higher chromosome aberration rate in sperm. In a man with 46,XY,t(3;6)(q21;q23) karyotype, about 53.2% of sperm carried out unbalanced chromosome assortment. To perform genetic test in infertility in the lack of any other organic and functional problems is reasonable in cases with low sperm count, recurrent foetal loss or premature ovarian dysfunction. In the knowledge of genetic alteration we can assess the genetic risk of the offspring and choose the appropriate mode of assisted reproduction. To determine the accurate genetic alteration of the embryo preimplantation and prenatal genetic diagnostics are needed. Unfortunately, the etiology in the background of infertility can not be clarified in all cases. The successfulness of the assisted reproduction techniques depends on the probability of genetic aberrations.

7. IRODALOMJEGYZÉK

- Afshan A. Triple X syndrome. *J Pak Med Assoc.* 2012; 62(4): 392-394.
- Allingham-Hawkins DJ, Babul-Hirji R, Chitayat D, Holden JJ, Yang KT, Lee C, Hudson R, Gorwill H, Nolin SL, Glicksman A, Jenkins EC, Brown WT, Howard-Peebles PN, Becchi C, Cummings E, Fallon L, Seitz S, Black SH, Vianna-Morgante AM, Costa SS, Otto PA, Mingroni-Netto RC, Murray A, Webb J, Vieri F. Fragile X premutation is a significant risk factor for premature ovarian failure: the International Collaborative POF in Fragile X study--preliminary data. *Am J Med Genet.* 1999; 83(4): 322-325.
- Antonelli A, Gandini L, Petrinelli P, Marcucci L, Elli R, Lombardo F, Dondero F, Lenzi A. Chromosomal alterations and male infertility. *J Endocrinol Invest.* 2000; 23(10): 677-683.
- Aran B, Blanco J, Vidal F, Vendrell JM, Egozcue S, Barri PN, Egozcue J, Veiga A. Screening for abnormalities of chromosomes X, Y, and 18 and for diploidy in spermatozoa from infertile men participating in an in vitro fertilization-intracytoplasmic sperm injection program. *Fertil Steril.* 1999; 72(4): 696-701.
- Bellovits O, Rusz A, Romics I, Csonka E, Hadlaczky Gy, Sótónyi P, Bujdosó Gy. Chromosomal aneuploidy in azoospermic men. *Int J Hum Genet.* 2006; 6: 171-176.
- Bernardini L, Martini E, Geraedts JP, Hopman AH, Lanteri S, Conte N, Capitanio GL. Comparison of gonosomal aneuploidy in spermatozoa of normal fertile men and those with severe male factor detected by in-situ hybridization. *Mol Hum Reprod.* 1997; 3(5): 431-438.
- Bernardini L, Borini A, Preti S, Conte N, Flamigni C, Capitanio GL, Venturini PL. Study of aneuploidy in normal and abnormal germ cells from semen of fertile and infertile men. *Hum Reprod.* 1998; 13(12): 3406-3413.

- Bertini V, Canale D, Bicocchi MP, Simi P, Valetto A. Mosaic ring Y chromosome in two normal healthy men with azoospermia. *Fertil Steril*. 2005; 84(6): 1744.
- Bhasin MK. Human population cytogenetics. *Int J Hum Genet*. 2005; 5: 83-152.
- Bielanska M, Tan SL, Ao A. Fluorescence in-situ hybridization of sex chromosomes in spermatozoa and spare preimplantation embryos of a Klinefelter 46, XY/47XXY male. *Hum Reprod*. 2000; 15: 440-444.
- Blanco P, Shlumukova M, Sargent CA, Jobling MA, Affara N, Hurles ME. Divergent outcomes of intrachromosomal recombination on the human Y chromosome: male infertility and recurrent polymorphism. *J Med Genet*. 2000; 37(10): 752-758.
- Blanco J, Egozcue J, Vidal F. Interchromosomal effects for chromosome 21 in carriers of structural chromosome reorganizations determined by fluorescence in situ hybridization on sperm nuclei. *Hum Genet*. 2000; 106(5): 500-505.
- Bonduelle M, Aytöz A, Van Assche E, Devroey P, Liebaers I, Van Steirteghem A. Incidence of chromosomal aberrations in children born after assisted reproduction through intracytoplasmic sperm injection. *Hum Reprod*. 1998; 13(4): 781-782.
- Bonduelle M, Van Assche E, Joris H, Keymolen K, Devroey P, Van Steirteghem A, Liebaers I. Prenatal testing in ICSI pregnancies: incidence of chromosomal anomalies in 1586 karyotypes and relation to sperm parameters. *Hum Reprod*. 2002; 17(10): 2600-2614.
- Calogero AE, De Palma A, Grazioso C, Barone N, Burrello N, Palermo I, Gulisano A, Pafumi C, D'Agata R. High sperm aneuploidy rate in unselected infertile patients and its relationship with intracytoplasmic sperm injection outcome. *Hum Reprod*. 2001; 16(7): 1433-1439.
- Celik-Ozenci C, Jakab A, Kovacs T, Catalanotti J, Demir R, Bray-Ward P, Ward D, Huszar G. Sperm selection for ICSI: shape properties do not predict the absence or presence of numerical chromosomal aberrations. *Hum Reprod*. 2004; 19(9): 2052-2059.

- Chandley AC, Edmond P, Christie S, Gowans L, Fletcher J, Frackiewicz A, Newton M. Cytogenetics and infertility in man. I. Karyotype and seminal analysis. *Ann Hum Genet.* 1975; 39: 231.
- Collodel G, Moretti E, Capitani S, Piomboni P, Anichini C, Estenoz M, Baccetti B. TEM, FISH and molecular studies in infertile men with pericentric inversion of chromosome 9. *Andrologia.* 2006; 38: 122-127.
- Cortés-Gutiérrez EI, Cerda-Flores RM, Dávila-Rodríguez MI, Hernández-Herrera R, Vargas-Villarreal J, Leal-Garza CH. Chromosomal abnormalities and polymorphisms in Mexican infertile men. *Arch Androl.* 2004; 50: 261-265.
- Coulam CB, Adamson SC, Annegers JF. Incidence of premature ovarian failure. *Obstet Gynecol.* 1986; 67(4): 604-606.
- De Braekeleer M, Dao TN. Cytogenetic studies in human spontaneous abortions. In: *Assisted Human Reproductive Technology* ed. Hafez, ESE Hemisphere Publication Company. 1991; pp. 41-45.
- de Carvalho CM, Zuccherato LW, Fujisawa M, Shirakawa T, Ribeiro-dos-Santos AK, Santos SE, Pena SD, Santos FR. Study of AZFc partial deletion gr/gr in fertile and infertile Japanese males. *J Hum Genet.* 2006; 51(9): 794-799.
- De Llanos M, Ballescà JL, Gázquez C, Margarit E, Oliva R. High frequency of gr/gr chromosome Y deletions in consecutive oligospermic ICSI candidates. *Hum Reprod.* 2005; 20(1): 216-220.
- Dix DJ, Allen JW, Collins BW, Mori C, Nakamura N, Poorman-Allen P, Goulding EH, Eddy EM. Targeted gene disruption of Hsp70-2 results in failed meiosis, germ cell apoptosis, and male infertility. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1996; 93(8): 3264-3268.

- Dixit H, Rao L, Padmalatha V, Raseswari T, Kapu AK, Panda B, Murthy K, Tosh D, Nallari P, Deenadayal M, Gupta N, Chakrabarthy B, Singh L. Genes governing premature ovarian failure. *Reprod Biomed Online*. 2010; 20(6): 724-740.
- Downie SE, Flaherty SP, Matthews CD. Detection of chromosomes and estimation of aneuploidy in human spermatozoa using fluorescence in-situ hybridization. *Mol Hum Reprod*. 1997; 3(7): 585-598.
- Eddy EM. Role of heat shock protein HSP70-2 in spermatogenesis. *Rev Reprod*. 1999; 4(1): 23-30.
- Egozcue J, Blanco J, Vidal F. Chromosome studies in human sperm nuclei using fluorescence in-situ hybridization (FISH). *Hum Reprod Update*. 1997; 3(5): 441-452.
- Egozcue S, Blanco J, Vendrell JM, García F, Veiga A, Aran B, Barri PN, Vidal F, Egozcue J. Human male infertility: chromosome anomalies, meiotic disorders, abnormal spermatozoa and recurrent abortion. *Hum Reprod Update*. 2000; 6(1): 93-105.
- Eiben B, Bartels I, Bähr-Porsch S, Borgmann S, Gatz G, Gellert G, Goebel R, Hammans W, Hentemann M, Osmer R, Rauskolb R, Hansmannet I. Cytogenetic analysis of 750 spontaneous abortions with the direct-preparation method of chorionic villi and its implications for studying genetic causes of pregnancy wastage. *Am J Hum Genet*. 1990; 47(4): 656-663.
- Escudero T, Abdelhadi I, Sandalinas M, Munné, S. Predictive value of sperm fluorescence in situ hybridization analysis on the outcome of preimplantation genetic diagnosis for translocations. *Fertil Steril*. 2003; 79 Suppl 3: 1528-1534.
- ESHRE Capri Workshop Group. Diagnosis and management of the infertile couple: missing information. *Hum Reprod Update*. 2004; 10: 295-307.

- Estop AM, Cieply K, Munne S, Surti U, Wakim A, Feingold E. Is there an interchromosomal effect in reciprocal translocation carriers? Sperm FISH studies. *Hum Genet.* 2000; 106(5): 517-524.
- Fagerstrom C, Himes P, Olson S. 47,XYY syndrome. In: Sex chromosome problems discovered through prenatal diagnosis. Pacific Northwest Regional Genetics Group. 2002.
- Ferlin A, Tessari A, Ganz F, Marchina E, Barlati S, Garolla A, Engl B, Foresta C. Association of partial AZFc region deletions with spermatogenic impairment and male infertility. *J Med Genet.* 2005; 42(3): 209-213.
- Ferlin A, Arredi B, Foresta C. Genetic causes of male infertility. *Reprod Toxicol.* 2006; 22: 133-141.
- Filipovic-Sadic S, Sah S, Chen L, Krosting J, Sekinger E, Zhang W, Hagerman PJ, Stenzel TT, Hadd AG, Latham GJ, Tassone F. A novel FMR1 PCR method for the routine detection of low abundance expanded alleles and full mutations in fragile X syndrome. *Clin Chem.* 2010; 56(3): 399-408.
- Foresta C, Ferlin A, Gianaroli L, Dallapiccola B. Guidelines for the appropriate use of genetic tests in infertile couples. *Eur J Hum Genet.* 2002; 10: 303-312.
- Gekas J, Thepot F, Turleau C, Siffroi JP, Dadoune JP, Briault S, Rio M, Bourouillou G, Carré-Pigeon F, Wasels R, Benzacken B. Chromosomal factors of infertility in candidate couples for ICSI: an equal risk of constitutional aberrations in women and men. *Hum Reprod.* 2001; 16(1): 82-90.
- Giachini C, Guarducci E, Longepied G, Degl'Innocenti S, Becherini L, Forti G, Mitchell MJ, Krausz C. The gr/gr deletion(s): a new genetic test in male infertility? *J Med Genet.* 2005; 42(6): 497-502.

- Giachini C, Laface I, Guarducci E, Balercia G, Forti G, Krausz C. Partial AZFc deletions and duplications: clinical correlates in the Italian population. *Hum Genet.* 2008; 124(4): 399-410.
- Gianaroli L, Magli MC, Ferraretti AP, Munné S, Balicchia B, Escudero T, Crippa A. Possible interchromosomal effect in embryos generated by gametes from translocation carriers. *Hum Reprod.* 2002; 17(12): 3201-3207.
- Giorlandino C, Calugi G, Iaconianni L, Santoro ML, Lippa A. Spermatozoa with chromosomal abnormalities may result in a higher rate of recurrent abortion. *Fertil Steril.* 1998; 70(3): 576-577.
- Gisselsson D, Kristoffersson U, Giwercman A. Ring Y chromosome in an azoospermic male with short stature: additional evidence for a distinct ring Y syndrome in non-mosaic patients? *Clin Genet.* 2003; 64(6): 519-521.
- Goldschmidt E, Márquez M, Solari A, Ziembar MI, Laudicina A. Phenotypic variability in 47, XXX patients: Clinical report of four new cases. *Arch Argent Pediatr.* 2010; 108(4): e88-91.
- Gravholt CH. Epidemiological, endocrine and metabolic features in Turner syndrome. *Eur J Endocrinol.* 2004; 151(6): 657-687.
- Gravholt CH. Turner syndrome in adulthood. *Horm Res.* 2005; 64 Suppl 2: 86-93.
- Guttenbach M, Schmid M. Determination of Y chromosome aneuploidy in human sperm nuclei by nonradioactive in situ hybridization. *Am J Hum Genet.* 1990; 46(3): 553-558.
- Hargreave T. Genetically determined male infertility and assisted reproduction techniques. *J Endocrinol Invest.* 2000; 23(10): 697-710.
- Hjerrild BE, Mortensen KH, Gravholt CH. Turner syndrome and clinical treatment. *Br Med Bull.* 2008; 86: 77-93.

- Honda H, Mihar N, Ohashi Y, Honda N, Hara T, Ohama K. Analysis of segregation and aneuploidy in two reciprocal translocation carriers, t(3;9)(q26.2;q32) and t(3;9)(p25;q32), by triple-color fluorescence in situ hybridization. *Hum Genet.* 1999; 105(5): 428-436.
- Hopps CV, Mielnik A, Goldstein M, Palermo GD, Rosenwaks Z, Schlegel PN. Detection of sperm in men with Y chromosome microdeletions of the AZFa, AZFb and AZFc regions. *Hum Reprod.* 2003; 18(8): 1660-1665.
- Hristova R, Ko E, Greene C, Rademaker A, Chernos J, Martin R. Chromosome abnormalities in sperm from infertile men with asthenoteratozoospermia. *Biol Reprod.* 2002; 66(6): 1781-1783.
- Hucklenbroich K, Gromoll J, Heinrich M, Hohoff C, Nieschlag E, Simoni M. Partial deletions in the AZFc region of the Y chromosome occur in men with impaired as well as normal spermatogenesis. *Hum Reprod.* 2005; 20(1): 191-197.
- Hundscheid RD, Sistermans EA, Thomas CM, Braat DD, Straatman H, Kiemeney LA, Oostra BA, Smits AP. Imprinting effect in premature ovarian failure confined to paternally inherited fragile X premutations. *Am J Hum Genet.* 2000; 66(2): 413-418.
- Huszar G, Corrales M, Vigue L. Correlation between sperm creatine phosphokinase activity and sperm concentrations in normospermic and oligospermic men. *Gamete Res.* 1988; 19(1): 67-75.
- Huszar G, Willetts M, Corrales M. Hyaluronic acid (Sperm Select) improves retention of sperm motility and velocity in normospermic and oligospermic specimens. *Fertil Steril.* 1990; 54(6): 1127-1134.
- Huszar G, Vigue L. Incomplete development of human spermatozoa is associated with increased creatine phosphokinase concentration and abnormal head morphology. *Mol Reprod Dev.* 1993; 34(3), 292-298.

- Huszar G, Vigue L, Oehninger S. Creatine kinase immunocytochemistry of human sperm-hemizona complexes: selective binding of sperm with mature creatine kinase-staining pattern. *Fertil Steril*. 1994; 61(1): 136-142.
- Huszar G, Sbracia M, Vigue L, Miller DJ, Shur BD. Sperm plasma membrane remodeling during spermiogenetic maturation in men: relationship among plasma membrane beta 1,4-galactosyltransferase, cytoplasmic creatine phosphokinase, and creatine phosphokinase isoform ratios. *Biol Reprod*. 1997; 56(4): 1020-1024.
- Huszar G, Stone K, Dix D, Vigue L. Putative creatine kinase M-isoform in human sperm is identified as the 70-kilodalton heat shock protein HspA2. *Biol Reprod*. 2000; 63(3): 925-932.
- Huszar G, Ozenci CC, Cayli S, Zavaczki Z, Hansch E, Vigue L. Hyaluronic acid binding by human sperm indicates cellular maturity, viability, and unreacted acrosomal status. *Fertil Steril*. 2003; 79 Suppl 3: 1616-1624.
- Huszar G, Jakab A, Sakkas D, Ozenci CC, Cayli S, Delpiano E, Ozkavukcu S. Fertility testing and ICSI sperm selection by hyaluronic acid binding: clinical and genetic aspects. *Reprod Biomed Online*. 2007; 14(5): 650-663.
- Huynh T, Mollard R, Trounson A. Selected genetic factors associated with male infertility. *Hum Reprod*. 2002; 8: 183-198.
- In't Veld PA, van Opstal D, Van den Berg C, Van Ooijen M, Brandenburg H, Pijpers L, Jahoda MG, Stijnen TH, Los FJ. Increased incidence of cytogenetic abnormalities in chorionic villus samples from pregnancies established by in vitro fertilization and embryo transfer (IVF-ET). *Prenat Diagn*. 1995; 15(10): 975-980.
- In't Veld PA, Broekmans FJ, de France HF, Pearson PL, Pieters MH, van Kooij RJ. Intracytoplasmic sperm injection (ICSI) and chromosomally abnormal spermatozoa. *Hum Reprod*. 1997; 12(4): 752-754.

- Jääskeläinen J. Molecular biology of androgen insensitivity. *Mol Cell Endocrinol.* 2012; 352(1-2): 4-12.
- Jackson L. Cytogenetics and molecular cytogenetics. *Clin Obstet Gynecol.* 2002; 45: 622-639.
- Jakab A, Kovács T, Kovanci E, Celik C, Vigue L, Borsos A, Ward DC, Huszár G. Numerical chromosome anomalies in human sperm at low sperm concentration. *Orv Hetil.* 2003; 144(30): 1473-1480.
- Jakab A, Sakkas D, Delpiano E, Cayli S, Kovanci E, Ward D, Revelli A, Huszar G. Intracytoplasmic sperm injection: a novel selection method for sperm with normal frequency of chromosomal aneuploidies. *Fertil Steril.* 2005; 84(6): 1665-1673.
- Jungwirth A, Giwercman A, Tournaye H, Diemer T, Kopa Z, Dohle G, Krausz C; EAU Working Group on Male Infertility. European association of urology guidelines on male infertility: the 2012 update. *Eur Urol.* 2012; 62(2): 324-332.
- Kalz L, Schwanitz G. Characterization of constitutive heterochromatin, in particular of fluorescence polymorphisms, in a Central European population. *Int J Hum Genet.* 2004; 4: 1-10.
- Kaur A, Mahajan S, Singh JR. Cytogenetic analysis in cases with sex anomalies. *Int J Hum Genet.* 2004; 4: 167-171.
- Klinikai Genetikai Szakmai Kollégium. Reprodukciós elégtelenség genetikai kivizsgálása. Az Egészségügyi Minisztérium szakmai protokollja. 2006.
- Kodandapani S, Pai MV, Nambiar J, Moka R. Premature ovarian aging in primary infertility: Triple X syndrome. *J Hum Reprod Sci.* 2011; 4(3): 153-154.
- Kornovski BS, McCoshen J, Kredentser J, Turley E. The regulation of sperm motility by a novel hyaluronan receptor. *Fertil Steril.* 1994; 61(5): 935-940.

- Kovacs P, Kovats T, Sajgo A, Szollosi J, Matyas S, Kaali SG. The role of hyaluronic acid binding assay in choosing the fertilization method for patients undergoing IVF for unexplained infertility. *J Assist Reprod Genet.* 2011; 28(1): 49-54.
- Kovanci E, Kovacs T, Moretti E, Vigue L, Bray-Ward P, Ward DC, Huszar G. FISH assessment of aneuploidy frequencies in mature and immature human spermatozoa classified by the absence or presence of cytoplasmic retention. *Hum Reprod.* 2001; 16(6): 1209-1217.
- Krausz C, Quintana-Murci L, McElreavey K. Prognostic value of Y deletion analysis: what is the clinical prognostic value of Y chromosome microdeletion analysis? *Hum Reprod.* 2000; 15(7): 1431-1434.
- Krausz C, Rajpert-De Meyts E, Frydelund-Larsen L, Quintana-Murci L, McElreavey K, Skakkebaek NE. Double-blind Y chromosome microdeletion analysis in men with known sperm parameters and reproductive hormone profiles: microdeletions are specific for spermatogenic failure. *J Clin Endocrinol Metab.* 2001; 86(6): 2638-2642.
- Krausz C. Male infertility: pathogenesis and clinical diagnosis. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab.* 2011; 25(2): 271-285.
- Laml T, Preyer O, Umek W, Hengstschlager M, Hanzal H. Genetic disorders in premature ovarian failure. *Hum Reprod Update.* 2002; 8: 483-491.
- Lanfranco F, Kamischke A, Zitzmann M, Nieschlag E. Klinefelter's syndrome. *Lancet.* 2004; 364(9430): 273-283.
- Lardone MC, Parodi DA, Ebensperger M, Peñaloza P, Cornejo V, Valdevenito R, Pommer R, Castro A. AZFc partial deletions in Chilean men with severe spermatogenic failure. *Fertil Steril.* 2007; 88(5): 1318-1326.
- Layman LC. Human gene mutations causing infertility. *J Med Genet.* 2002; 39: 153-161.
- Lejuene J. Autosomal disorders. *Pediatrics.* 1963; 32: 326-337.

- Lewis-Jones DI, Gazvani MR, Mountford R. Cystic fibrosis in infertility: screening before assisted reproduction. *Hum Reprod.* 2000; 15: 2415-2417.
- Liehr T, Ziegler M, Starke H, Heller A, Kuechler A, Kittner G, Beensen V, Seidel J, Häßler H, Müsebeck J, Claussen U. Conspicuous GTG-banding results of the centromere-near region can be caused by alphoid DNA heteromorphism. *Clin Genet.* 2003; 64: 166-167.
- Lim AST, Fong Y, Ling Yu S. Analysis of the sex chromosome constitution of sperm in men with a 47,XYY mosaic karyotype by fluorescence in situ hybridization. *Fertil Steril.* 1999; 72: 121-123.
- Lim AS, Lim TH, Kee SK, Chieng R, Tay SK. Sperm segregation patterns by fluorescence in situ hybridization studies of a 46,XY,t(2;6) heterozygote giving rise to a rare triploid product of conception with a 69,XXY,t(2;6)(p12;q24)der(6)t(2;6)(p12;q24)pat karyotype. *Am J Med Genet A.* 2003; 117A(2): 172-176.
- Luciani JM, Guichaoua MR, Mattei A, Morazzani MR. Pachytene analysis of a man with a 13q;14q translocation and infertility. Behavior of the trivalent and nonrandom association with the sex vesicle. *Cytogenet Cell Genet.* 1984; 38(1): 14-22.
- Luetjens CM, Gromoll J, Engelhardt M, Von Eckardstein S, Bergmann M, Nieschlag E, Simoni M. Manifestation of Y-chromosomal deletions in the human testis: a morphometrical and immunohistochemical evaluation. *Hum Reprod.* 2002; 17b(9): 2258-2266.
- Lynch M, Cram DS, Reilly A, O'Bryan MK, Baker HW, de Kretser DM, McLachlan RI. The Y chromosome gr/gr subdeletion is associated with male infertility. *Mol Hum Reprod.* 2005; 11(7): 507-512.
- Machev N, Saut N, Longepied G, Terriou P, Navarro A, Levy N, Guichaoua M, Metzler-Guillemain C, Collignon P, Frances AM, Belougne J, Clemente E, Chiaroni J, Chevillard C, Durand C, Ducourneau A, Pech N, McElreavey K, Mattei MG, Mitchell

- MJ. Sequence family variant loss from the AZFc interval of the human Y chromosome, but not gene copy loss, is strongly associated with male infertility. *J Med Genet.* 2004; 41(11): 814-825.
- Maduro MR, Lamb DJ. Understanding the new genetics of male infertility. *J Urol.* 2002; 168: 2197-2205.
- Mark HFL, Sigman M. Male infertility associated with unique 8;22 translocation. *Exp Mol Pathol.* 1999; 67: 57-61.
- Marozzi A, Vegetti W, Manfredini E, Tibiletti MG, Testa G, Crosignani PG, Ginelli E, Meneveri R, Dalprà L. Association between idiopathic premature ovarian failure and fragile X premutation. *Hum Reprod.* 2000; 15(1): 197-202.
- Martin RH, Shi Q, Field LL. Recombination in the pseudoautosomal region in a 47,XXY male. *Hum Genet.* 2001; 109: 143-145.
- Martini E, von Bergh AR, Coonen E, de Die-Smulders CE, Hopman AH, Ramaekers FC, Geraedts JP. Detection of structural abnormalities in spermatozoa of a translocation carrier t(3;11)(q27.3;q24.3) by triple FISH. *Hum Genet.* 1998; 102(2): 157-165.
- Mikelsaar R, Pauklin M, Lissitsina J, Punab M. Reciprocal translocation t(7;16)(q21.2;p13.3) in an infertile man. *Fertil Steril.* 2006; 86: 719e9-719e11.
- Mizuno K, Kojima Y, Tozawa K, Sasaki S, Hayashi Y, Kohri K. Molecular evaluation of the SRY gene for gonads of patients with mixed gonadal dysgenesis. *Int J Urol.* 2005; 12: 673-676.
- Morel F, Roux C, Bresson JL. Segregation of sex chromosomes in spermatozoa of 46,XY/47,XXY men by multicolour fluorescence in-situ hybridisation. *Mol Hum Reprod.* 2000; 6: 566-570.

- Morel F, Douet-Guilbert N, Le Bris MJ, Herry A, Amice V, Amice J, De Braekeleer M. Meiotic segregation of translocations during male gametogenesis. *Int J Androl*. 2004; 27(4): 200-212.
- Munné S, Escudero T, Sandalinas M, Sable D, Cohen J. Gamete segregation in female carriers of Robertsonian translocations. *Cytogenet Cell Genet*. 2000; 90(3-4): 303-308.
- Nagvenkar P, Desai K, Hinduja I, Zaveri K. Chromosomal studies in infertile men with oligozoospermia and non-obstructive azoospermia. *Indian J Med Res*. 2005; 122: 34-42.
- Németh K, Holics K, Újhelyi R, Váradi A, Fekete Gy. A cisztás fibrózis öt mutációjának vizsgálata a magyar populációban. *Orv Hetil*. 1996; 137: 899-903.
- Nodar F, Vincentiis S, Olmedo SB, Papier S, Urrutia F, Acosta AA. Birth of twin males with normal karyotype after intracytoplasmic sperm injection with use of testicular spermatozoa from a nonmosaic patient with Klinefelter's syndrome. *Fertil Steril*. 1999; 71: 1149-1152.
- Navarro-Costa P, Pereira L, Alves C, Gusmão L, Proença C, Marques-Vidal P, Rocha T, Correia SC, Jorge S, Neves A, Soares AP, Nunes J, Calhaz-Jorge C, Amorim A, Plancha CE, Gonçalves J. Characterizing partial AZFc deletions of the Y chromosome with amplicon-specific sequence markers. *BMC Genomics*. 2007; 8: 342.
- Navarro-Costa P, Gonçalves J, Plancha CE. The AZFc region of the Y chromosome: at the crossroads between genetic diversity and male infertility. *Hum Reprod Update*. 2010; 16(5): 525-542.
- Oates RD, Silber S, Brown LG, Page DC. Clinical characterization of 42 oligospermic or azoospermic men with microdeletion of the AZFc region of the Y chromosome, and of 18 children conceived via ICSI. *Hum Reprod*. 2002; 17(11): 2813-2824.

- Oliver-Bonet M, Navarro J, Carrera M, Egozcue J, Benet J. Aneuploid and unbalanced sperm in two translocation carriers: evaluation of the genetic risk. *Mol Hum Reprod.* 2002; 8(10): 958-963.
- Pang MG, Hoegerman SF, Cuticchia AJ, Moon SY, Doncel GF, Acosta AA, Kearns WG. Detection of aneuploidy for chromosomes 4, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 17, 18, 21, X and Y by fluorescence in-situ hybridization in spermatozoa from nine patients with oligoasthenoteratozoospermia undergoing intracytoplasmic sperm injection. *Hum Reprod.* 1999; 14(5): 1266-1273.
- Patsalis PC, Sismani C, Quintana-Murci L, Taleb-Bekkouche F, Krausz C, McElreavey K. Effects of transmission of Y chromosome AZFc deletions. *Lancet.* 2002; 360(9341): 1222-1224.
- Parmegiani L, Cognigni GE, Bernardi S, Troilo E, Ciampaglia W, Filicori M. "Physiologic ICSI": hyaluronic acid (HA) favors selection of spermatozoa without DNA fragmentation and with normal nucleus, resulting in improvement of embryo quality. *Fertil Steril.* 2010; 93(2): 598-604.
- Pernice F, Mazza G, Puglisi D, Luppino MG, Frisina N. Nonrobertsonian translocation t(6;11) is associated with infertility in an oligozoospermic male. *Fertil Steril.* 2002; 78: 192-194.
- Perrin A, Morel F, Douet-Guilbert N, Le Bris MJ, Amice J, Amice V, De Braekeleer M. A study of meiotic segregation of chromosomes in spermatozoa of translocation carriers using fluorescent in situ hybridisation. *Andrologia.* 2010; 42(1): 27-34.
- Pienna Videau S, Araujo H, Ballesta F, Ballesca JL, Vanrell JA. Chromosomal abnormalities and polymorphisms in infertile men. *Arch Androl.* 2001; 46: 205-210.
- Powell CM, Taggart RT, Drumheller TC, Wangsa D, Qian C, Nelson LM, White BJ. Molecular and cytogenetic studies of an X;autosome translocation in a patient with

- premature ovarian failure and review of the literature. *Am J Med Genet.* 1994; 52(1): 19-26.
- Powell CM. Sex chromosomes and sex chromosome abnormalities. In: *The Principles of Clinical Cytogenetics* ed. Gersen SL, Keagle MB, Humana Press, Totowa, New Jersey. 1999; pp. 229-250.
- Ranganathan S, Ganguly AK, Datta K. Evidence for presence of hyaluronan binding protein on spermatozoa and its possible involvement in sperm function. *Mol Reprod Dev.* 1994; 38(1): 69-76.
- Repping S, Skaletsky H, Lange J, Silber S, Van Der Veen F, Oates RD, Page DC, Rozen S. Recombination between palindromes P5 and P1 on the human Y chromosome causes massive deletions and spermatogenic failure. *Am J Hum Genet.* 2002; 71(4): 906-922.
- Repping S, Skaletsky H, Brown L, van Daalen SK, Korver CM, Pyntikova T, Kuroda-Kawaguchi T, de Vries JW, Oates RD, Silber S, van der Veen F, Page DC, Rozen S. Polymorphism for a 1.6-Mb deletion of the human Y chromosome persists through balance between recurrent mutation and haploid selection. *Nat Genet.* 2003; 35(3): 247-251.
- Rives N, Saint Clair A, Mazurier S, Sibert L, Siméon N, Joly G, Macé B. Relationship between clinical phenotype, semen parameters and aneuploidy frequency in sperm nuclei of 50 infertile males. *Hum Genet.* 1999; 105(3): 266-272.
- Rubio C, Simón C, Blanco J, Vidal F, Mínguez Y, Egozcue J, Crespo J, Remohí J, Pellicer A. Implications of sperm chromosome abnormalities in recurrent miscarriage. *J Assist Reprod Genet.* 1999; 16(5): 253-258.
- Rousseaux S, Chevret E, Monteil M, Cozzi J, Pelletier R, Devillard F, Lespinasse J, Sèle B. Meiotic segregation in males heterozygote for reciprocal translocations: analysis of

- sperm nuclei by two and three colour fluorescence in situ hybridization. *Cytogenet Cell Genet.* 1995; 71(2): 126-130.
- Sazci A, Ercelen N, Ergul E, Akpinar G. Male factor in fertility associated with a familial translocation t(1;13)(q24;q10). *Fertil Steril.* 2005; 5: 1548-1550.
- Sánchez Fuentes S, Amaya García MJ, Enciso Izquierdo FJ, Moyano Calvente SL. 46 XX Male syndrome. *Endocrinol Nutr.* 2012; 59(4): 276-278.
- Sbracia M, Grasso J, Sayme N, Stronk J, Huszar G. Hyaluronic acid substantially increases the retention of motility in cryopreserved/thawed human spermatozoa. *Hum Reprod.* 1997; 12(9): 1949-1954.
- Shaffer LG, Tommerup N. *ISCN 2009: An International System for Human Cytogenetic Nomenclature.* S Karger, Basel, 2009.
- Shelling AN. Premature ovarian failure. *Reproduction.* 2010; 140(5): 633-641.
- Shi Q, Martin RH. Aneuploidy in human sperm: a review of the frequency and distribution of aneuploidy, effects of donor age and lifestyle factors. *Cytogenet Cell Genet.* 2000; 90(3-4): 219-226.
- Shi Q, Martin RH. Aneuploidy in human spermatozoa: FISH analysis in men with constitutional chromosomal abnormalities, and in infertile men. *Reproduction.* 2001; 121(5): 655-666.
- Silber SJ, Repping S. Transmission of male infertility to future generations: lessons from the Y chromosome. *Hum Reprod.* 2002; 8: 217-229.
- Simoni M, Bakker E, Krausz C. EAA/EMQN best practice guidelines for molecular diagnosis of Y-chromosomal microdeletions. State of the art 2004. *Int J of Andrology.* 2004; 27: 240-249.
- Skaletsky H, Kuroda-Kawaguchi T, Minx PJ, Cordum HS, Hillier L, Brown LG, Repping S, Pyntikova T, Ali J, Bieri T, Chinwalla A, Delehaunty A, Delehaunty K, Du H, Fewell

- G, Fulton L, Fulton R, Graves T, Hou SF, Latrielle P, Leonard S, Mardis E, Maupin R, McPherson J, Miner T, Nash W, Nguyen C, Ozersky P, Pepin K, Rock S, Rohlfing T, Scott K, Schultz B, Strong C, Tin-Wollam A, Yang SP, Waterston RH, Wilson RK, Rozen S, Page DC. The male-specific region of the human Y chromosome is a mosaic of discrete sequence classes. *Nature*. 2003; 423(6942): 825-837.
- Staessen C, Tournaye H, Assche E, Michiels A, Landuy L, Devroey P, Liebaers L, Steirteghem A. PGD in 47,XXY Klinefelter's syndrome patients. *Hum Reprod*. 2003; 9: 319-330.
- Storeng RT, Plachot M, Theophile D, Mandelbaum J, Belaisch-Allart J, Vekemans M. Incidence of sex chromosome abnormalities in spermatozoa from patients entering an IVF or ICSI protocol. *Acta Obstet Gynecol Scand*. 1998; 77(2): 191-197.
- Stouffs K, Tournaye H, Van der Elst J, Haentjens P, Liebaers I, Lissens W. Do we need to search for gr/gr deletions in infertile men in a clinical setting? *Hum Reprod*. 2008; 23(5): 1193-1199.
- Strachan T, Read AP. *Human molecular genetics* 3. Garland Publishing, New York, USA. 2004.
- Syme RM, Martin RH. Meiotic segregation of a 21;22 Robertsonian translocation. *Hum Reprod*. 1992; 7(6): 825-829.
- Tassone F, Pan R, Amiri K, Taylor AK, Hagerman PJ. A rapid polymerase chain reaction-based screening method for identification of all expanded alleles of the fragile X (FMR1) gene in newborn and high-risk populations. *J Mol Diagn*. 2008; 10(1): 43-49.
- van der Ven K, Peschka B, Montag M, Lange R, Schwanitz G, van der Ven HH. Increased frequency of congenital chromosomal aberrations in female partners of couples undergoing intracytoplasmic sperm injection. *Hum Reprod*. 1998; 13(1): 48-54.

- Vegetti W, Grazia Tibiletti M, Testa G, de Lauretis Yankowski, Alagna F, Castoldi E, Taborelli M, Motta T, Bolis PF, Dalprà L, Crosignani PG. Inheritance in idiopathic premature ovarian failure: analysis of 71 cases. *Hum Reprod.* 1998; 13(7): 1796-1800.
- Vegetti W, Marozzi A, Manfredini E, Testa G, Alagna F, Nicolosi A, Caliarì I, Taborelli M, Tibiletti MG, Dalprà L, Crosignani PG. Premature ovarian failure. *Mol Cell Endocrinol.* 2000; 161(1-2): 53-57.
- Vetro A, Ciccone R, Giorda R, Patricelli MG, Della Mina E, Forlino A, Zuffardi O. XX males SRY negative: a confirmed cause of infertility. *J Med Genet.* 2011; 48(10): 710-712.
- Vicdan A, Vicdan K, Günalp S, Kence A, Akarsu C, Zeki Isik A, Sözen E. Genetic aspects of human male infertility: the frequency of chromosomal abnormalities and Y chromosome microdeletion in severe male factor infertility. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol.* 2004; 117: 49-54.
- Visootsak J, Aylstock M, Graham JM. Klinefelter syndrome and its variants: An update and review for the primary pediatrician. *Clin Pediatr.* 2001; 40: 639-651.
- Vogt PH, Edelmann A, Kirsch S, Henegariu O, Hirschmann P, Kiesewetter F, Köhn FM, Schill WB, Farah S, Ramos C, Hartmann M, Hartschuh W, Meschede D, Behre HM, Castel A, Nieschlag E, Weidner W, Gröne HJ, Jung A, Engel W, Haidl G. Human Y chromosome azoospermia factors (AZF) mapped to different subregions in Yq11. *Hum Mol Genet.* 1996; 5(7): 933-943.
- Vozdova M, Oracova E, Horinova V, Rubes J. Sperm fluorescence in situ hybridization study of meiotic segregation and an interchromosomal effect in carriers of t(11;18). *Hum Reprod.* 2008; 23(3): 581-588.
- Wang JY, Samura O, Zhen DK, Cowan JM, Cardone V, Summers M, Bianchi DW. Fluorescence in-situ hybridization analysis of chromosomal constitution in spermatozoa from a mosaic 47,XYY/46XY male. *Mol Hum Reprod.* 2000; 6: 665-668.

- WHO laboratory manual for the examination and processing of human semen. 2010; 5: 271.
- Wu B, Lu NX, Xia YK, Gu AH, Lu CC, Wang W, Song L, Wang SL, Shen HB, Wang XR. A frequent Y chromosome b2/b3 subdeletion shows strong association with male infertility in Han-Chinese population. *Hum Reprod.* 2007; 22(4): 1107-1113.
- Yagci A, Murk W, Stronk J, Huszar G. Spermatozoa bound to solid state hyaluronic acid show chromatin structure with high DNA chain integrity: an acridine orange fluorescence study. *J Androl.* 2010; 31(6): 566-572.
- Yang Y, Ma M, Li L, Zhang W, Xiao C, Li S, Ma Y, Tao D, Liu Y, Lin L, Zhang S. Evidence for the association of Y-chromosome haplogroups with susceptibility to spermatogenic failure in a Chinese Han population. *J Med Genet.* 2008; 45(4): 210-215.
- Zaragoza MV, Surti U, Redline RW, Millie E, Chakravarti A, Hassold TJ. Parental origin and phenotype of triploidy in spontaneous abortions: predominance of diandry and association with the partial hydatidiform mole. *Am J Hum Genet.* 2000; 66(6): 1807-1820.
- Zenteno-Ruiz JC, Kofman-Alfaro S, Mendez JP. 46,XX sex reversal. *Arch Med Res.* 2001; 32: 559-566.
- Zeyneloglu HB, Baltaci V, Ege S, Haberal A, Batioglu S. Detection of chromosomal abnormalities by fluorescent in-situ hybridization in immotile viable spermatozoa determined by hypo-osmotic sperm swelling test. *Hum Reprod.* 2000; 15(4): 853-856.
- Zhang QF, Lu GX. Investigation of the frequency of chromosomal aneuploidy using triple fluorescence in situ hybridisation in 12 Chinese infertile men. *Chin Med J.* 2004; 117: 503-506.
- Zhang F, Li Z, Wen B, Jiang J, Shao M, Zhao Y, He Y, Song X, Qian J, Lu D, Jin L. A frequent partial AZFc deletion does not render an increased risk of spermatogenic impairment in East Asians. *Ann Hum Genet.* 2006; 70(Pt3): 304-313.

Iktatószám: DEENKÉTK/366/2012.
Tételszám:
Tárgy: Ph.D. publikációs lista

Jelölt: Mokánszki Attila

Neptun kód: WT0X7Z

Doktori Iskola: Klinikai Orvostudományok Doktori Iskola

A PhD értekezés alapjául szolgáló közlemények

1. **Mokánszki A.,** Ujfalusi A., Balogh E., Molnár Z., Sápy T., Jakab A., Varga A., Oláh É.: Infertilitásban végzett citogenetikai és molekuláris genetikai vizsgálatok a kelet-magyarországi régióban.
Orv. Hetil. 153 (2), 51-60, 2012.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1556/OH.2013.29510>
2. **Mokánszki, A.,** Ujfalusi, A., Balogh, E., Sümegi, A., Antal-Szalmás, P., Bazsáné Kassai, Z., Molnár, Z., Varga, A., Sápy, T., Jakab, A., Oláh, É.: Meiotic segregation study of a novel t(3;6)(q21;q23) in an infertile man using fluorescence in situ hybridization (FISH).
Syst. Biol. Reprod. Med. 58 (3), 160-164, 2012.
DOI: <http://dx.doi.org/10.3109/19396368.2012.670868>
IF:1.524 (2011)
3. **Mokánszki, A.,** Molnár, Z., Ujfalusi, A., Balogh, E., Bazsáné Kassai, Z., Varga, A., Jakab, A., Oláh, É.: Correlation study between sperm concentration, hyaluronic acid-binding capacity and sperm aneuploidy in Hungarian patients.
Reprod. Biomed. Online. 25 (6), 620-626, 2012.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.rbmo.2012.08.003>
IF:2.042 (2011)
4. **Mokánszki A.,** Ujfalusi A., Balogh E., Sümegi A., Balogh I., Tóthné Varga E., Bodnár B., Varga A., Oláh É.: Az Y-kromoszóma mikrodelecióinak és parciális mikrodelecióinak vizsgálata idiopátiás infertilitásban.
Magyar Androl. 17 (1), 17-21, 2012.



További Közlemények

5. **Mokánszki, A.**, Körhegyi, I., Szabó, N., Bereg, E., Gergev, G., Balogh, E., Bessenyei, B., Sümegi, A., Morris-Rosendahl, D.J., Sztriha, L., Oláh, É.: Lissencephaly and Band Heterotopia: LIS1, TUBA1A, and DCX Mutations in Hungary.
J. Child Neurol. Epub ahead of print (2012)
DOI: <http://dx.doi.org/10.1177/0883073811436326>
IF:1.748 (2011)
6. Molnár, Z., **Mokánszki, A.**, Benyó, M., Kassai, Z., Oláh, É., Jakab, A.: Sperm fertilization potential and chromosomal anomalies in testicular cancer before chemotherapy.
Hum. Reprod. 26 (2011), i253, 2011.

Összesített impakt faktor: 5.314

Összesített impakt faktor: (értekezés alapjául szolgáló közlemények esetén): 3.566

A DEENK Kenézy Élettudományi Könyvtár a Jelölt által a Publikációs Adatbázisba feltöltött adatok bibliográfiai és tudományometriai ellenőrzését a tudományos adatbázisok és a Journal Citation Reports Impact Factor lista alapján elvégezte.

Debrecen, 2012.12.07



8. TÁRGYSZAVAK

Férfi és női infertilitás/ Male and female infertility

Kromoszóma eltérések/ Chromosome aberrations

Citogenetika / Citogenetics

FISH / FISH

Génmutációk / Gene mutations

Y kromoszóma mikrodeléció és parciális mikrodeléció / Y chromosome microdeletion and partial microdeletion

Spermium kromoszóma aberráció / Sperm chromosome aberration

Hialuronsav-receptor / Hialuronic acid-receptor

Hialuronsav kötődési teszt / Hyaluronic acid-binding assay

Non-diszjunkció / Non-disjunction

Szegregációs analízis / Segregation analysis

FMR1 gén / *FMR1* gene

9. KÖSZÖNETNYÍLVÁNÍTÁS

Különleges köszönettel tartozom mindennek előtt témavezetőmnek, Prof. Dr. Oláh Évának, a Debreceni Egyetem, Orvos- és Egészségtudományi Centrum (DE OEC), Gyermekgyógyászati Intézet, Klinikai Genetikai Központ igazgatójának, aki lehetővé tette számomra a munkacsoportba való bekapcsolódást, aki ötleteivel és kritikáival hozzájárult az értekezés, valamint az értekezés alapjául szolgáló dolgozatok elkészítéséhez.

Köszönettel tartozom Dr. Ujfalusi Anikónak, a DE OEC, Gyermekgyógyászati Intézet, Klinikai Genetikai Központ, Regionális Genetikai Laboratórium vezetőjének, egyetemi adjunktusnak, valamint Dr. Balogh Erzsébet, tudományos főmunkatársnak, a citogenetikai és FISH vizsgálatok elvégzésében és az értekezés alapjául szolgáló dolgozatok kísérletes kivitelezésében nyújtott segítségükért, valamint a dolgozatok megírásához nélkülözhetetlen kritikus észrevételeikért.

Hálás köszönet illeti Dr. Jakab Atillát, a DE OEC, Szülészeti és Nőgyógyászati Klinika egyetemi docensét a spermium FISH vizsgálatokban nyújtott technikai együttműködéséért és a témához kapcsolódó dolgozatok elkészítésében készséges segítségéért, valamint Dr. Molnár Zsuzsannát, a DE OEC, Szülészeti és Nőgyógyászati Klinika Ph.D. hallgatóját a hialuronsav-kötődési és FISH vizsgálatokban való közreműködéséért.

Köszönet illeti Prof. Dr. Huszár Gábor akadémikus urat, a Yale Orvostudományi Egyetem, Szülészeti és Nőgyógyászati Klinika, Spermium Fiziológiás Laboratóriumának vezetőjét az értekezés alapjául szolgáló dolgozatok elkészítésében nyújtott segítségéért.

Köszönöm Dr. Varga Attilának, a DE OEC, Urológiai Klinika egyetemi docensének, Dr. Bazsáné Dr. Kassai Zsuzsának, a DE OEC Szülészeti és Nőgyógyászati Klinika Andrológiai és Krioprezervációs Laboratórium vezetőjének, Dr. Sápy Tamásnak, a DE OEC Szülészeti és Nőgyógyászati Klinika Meddőségi szakrendelés vezetőjének, egyetemi

adjunktusnak, Dr. Tóthné Varga Emesének, a Debreceni Kaáli Intézet biológusának vizsgálataim során a folyamatos beteganyag biztosítását.

Hálásan köszönöm Bessenyei Beáta, molekuláris biológus, Ph.D. hallgató, Orvos Gáborné, Bodnár Ferencné és Nagy Éva humángenetikai szakaszsztenseknek a vizsgálati anyag technikai feldolgozásában nyújtott közreműködését.