Egyetemi doktori (Ph.D.) értekezés tézisei

A SPERMIUMOK KÜLÖNBÖZŐ ÉRETLENSÉGI FORMÁINAK ÉS KROMOSZÓMA NON DISZJUNKCIÓINAK KAPCSOLATA - EREDMÉNYEK UGYANAZON SEJTEK KETTŐS FESTÉSÉVEL

Dr. Óvári László

DEBRECENI EGYETEM

Klinikai Orvostudományok Doktori Iskola

Debrecen, 2009

Egyetemi Doktori (Ph.D.) értekezés védése
A doktorjelölt neve: Dr. Óvári László

Az értekezés címe: A spermiumok különböző éretlenségi formáinak és kromoszóma non diszjunkcióinak kapcsolata-eredmények ugyanazon sejtek kettős festésével

Doktori Iskola: Klinikai Orvostudományok Doktori Iskola

A szigorlati bizottság

Elnöke: Prof. Dr. Nemes Zoltán, az MTA doktora
Tagok: Dr. Csécsei Károly, kandidátus
Dr. Varga Attila, kandidátus

Bíráló bizottság

Elnöke: Prof. Dr. Nemes Zoltán, az MTA doktora
Opponensek: Prof. Dr. Szöllősi János, kandidátus
Dr. Krasznai Zoltán, kandidátus
Tagok: Dr. Csécsei Károly, kandidátus
Dr. Varga Attila, kandidátus

A vita időpontja és helye: 2009. november 13. péntek, 12.00, DEOEC I. Belgyógyászati Klinika Tanterme

1. Bevezetés és a disszertáció céljai

Az infertilitásban a férfi faktor vizsgálati módszerei között egyre több kutatás igazolja az objektív biokémiai markerek előnyeit a spermiumok érettségének és funkciójának megbízható megítélésében.

A meiózis során a diploid spermatogóniumok kétszakaszos oszlási folyamatban haploid spermatidokká alakulnak. A spermiogenezis során a haploid kerek spermatidok mind a nukleáris, mind a celluláris kompartmentben érési folyamatokon esnek át, melyek magukba foglalják a hiszton-protamin cserét, az akroszóma fejlődést, a citoplazma extrúzióját, valamint a farok képződését. A citoplazmatikus extrúzióval összefüggésben, a spermium sejthártya is átalakul a késői spermiogenezisben (remodeling), mely során a zona pellucida és hialuronsav kötő helyek is kialakulnak.

Többféle nukleáris és citoplazmatikus biokémiai marker vizsgálatot ismerünk, melyek utalhatnak a spermiumok éretlenség fokára. A spermium éretlenségét mégis legjobban a 70 kilodalton tömegű chaperon protein, a HspA2 alacsony expressziója jelzi legjobban, ami a normális spermium fejlődés során két szakaszban expresszálódik. Az első expressziós szakasz a kerek spermatocitákban jelentkezik, ekkor a spermatogenetikus folyamatban játszott funkcióját illetően a HspA2 tagja a szinaptonémális komplexnek (SC), és fenntartja a meiózis folyamatát. A második, nagyobb expressziós hullám az elongáció stádiumában levő spermatidokban jelentkezik, és az HspA2-nak szerepe van olyan proteinek összeszerelésében és transzportjában, amelyek a spermium éréséhez szükségesek, köztük citoplazma extrúziójához és a sejthártya remodelinghez szüksége proteinek. Emellett az HspA2 a legfontosabb szabályzó faktora a nukleoprotein cseréjéhez, éréséhez szükséges protaminok produkciójának és transzportjának, valamint antiapoptotikus funkciója is van.

Az HspA2 alacsony expressziójához kapcsolódó spermatogenetikus zavar a spermiumok különféle érési zavarával, abnormalitásaival társul. Ezek az eltérések különböző biokémiai markerekkel jól detektálhatóak úgy, mint spermium kreatin-

kináz (CK) tartalom kimutatása immunfestéssel, ami a többlet citoplazmát jelzi, anilinkék festés (AB), ami a perzisztáló szomatikus hisztonokat mutatja, a caspase-3 immuncitokémia, ami az aktív apoptotikus folyamatot jelzi, és a DNS fragmentációt jelző különféle tesztek, köztük az in situ nick transzláció (ISNT). Mivel a HspA2 esszenciális része a szinaptonémális komplexnek, nélkülözhetetlen a homológ kromoszómapárok deszinapszisához az HspA2 alacsony expressziójával járó immaturitás emelkedett frekvenciájú kromoszóma diszómiával is társul. A diszómia frekvenciát legjobban fluoreszcens is situ hibridizációval (FISH) tudjuk vizsgálni.

Különféle tanulmányokban, amelyekben nagyszámú éretlen spermiumot tartalmazó mintákat vizsgáltak szoros korreláció volt észlelhető az immaturitás különböző megjelenési formáinak (nukleáris, celluláris tulajdonságok) gyakoriságában ugyanabban a mintában, akárcsak az immaturitás jeleinek gyakorisága és az aneuploidia frekvencia között adott spermium mintákban.

Az előbb említett tanulmányok igazolták a HspA2 spermiumképződésben betöltött központi szerepét, illetve azt, hogy alacsony expressziója esetén a spermium mintában a különböző éretlenségi jelek, és a kromoszóma diszómiák nagyobb gyakorisága várható. Nincs adat arra vonatkozólag, hogy ezek a celluláris és nukleáris éretlenségi jelek, valamint diszómiák vajon ugyanazokat a sejteket érintik-e, illetve a spermiogenetikus abnormalitások azonos mértékben jelennek-e meg egyes sejtekben.

Az elképzelésem a kutatómunkámban az volt, hogy ha az HspA2 alacsony expressziója a közös oki faktora a spermiumok immaturitásának és a meiótikus nondiszjunkcióknak, akkor ugyanazon sejtek többes biokémiai marker vizsgálatával, valamint FISH jelölésével elsősorban a különböző abnormalitások kombinációját kell, hogy észleljük az éretlen sejtekben, és nem izolált elváltozásokat. Emellett feltételeztem, hogy nem csak kolokalizáltan kell, hogy ezek az abnormalitások megjelenjenek, hanem ugyancsak a közös oki faktor miatt az elváltozások mértékének is hasonlónak kell lennie. Amennyiben igaz az elképzelésem, és sikerül igazolni, hogy a különböző éretlenségi jelek azonos sejtekben, hasonló mértékben mutathatóak ki, és emellett ugyanezekben a sejtekben gyakoribbak a kromoszóma

diszómiák is, akkor ez tovább erősíti a HspA2 központi szerepére vonatkozó elképzelésünket, valamint a férfi meddőség labordiagnosztikája számára is több következtetést le lehet vonni, mint pl. egy próba alkalmazása elegendő-e a spermiumok éretlenségének korrekt vizsgálatára, stb.

Abból a célból, hogy vizsgáljuk a különféle alacsony HspA2 expressziójához kötött spermium érési zavarok együttes előfordulását individuális spermiumokban, egy egymást követő többes biokémia jelölési módszert fejlesztettünk ki. Az AB, ami egy megbízható marker a spermiumok nukleoprotein éretlenségének vizsgálatában, egy reverzibilisen kötődő festék és a jelölt spermiumokból a festék egyszerű mosási technikákkal kivonható. Sajátosan az ecetsav, ami az AB oldószere komponense olyan biokémiai marker festések fixáló oldatainak, mint a FISH, CK és caspase-3 immuncitokémia, valamint használják az ISNT-ban is. A spermiumok kettős marker vizsgálatát a nukleoprotein szerkezet vizsgálatával kezdtünk AB festéssel, majd a festék kimosását követően a spermiumok vizsgálatát FISH, CK immuncitokémia, apoptózis vizsgálat, illetve ISNT valamelyikével folytattuk. Az individuális spermiumok és mikroszkópos spermium területek lokalizációját-relokalizációját az adatok összehasonlítását a Metamorph™ digitális képértékelő program segítségével végeztük.

A Metamorh™ digitális képértékelő program alkalmazásával a relokalizáció segítése mellett a spermiumok morfológiáját is vizsgálni tudtuk, ezért az egyedi spermiumok objektív biokémiai marker vizsgálata mellett ugyanezen sejtek biokémiai érettségi státuszához viszonyítva a morfológiai jellemzőit is vizsgáltuk.

Egy külön tanulmányban szintén Metamorh™ segítségével a natív, nem dekondenzált haploid illetve a diszómiás sejtek morfometriai különbségeit is vizsgáltuk. Ezt azért végeztük, hogy olyan morfológiai különbségeket keressük a klinikum számára, melyek a spermium szelekció biztonságosságát növelhetik ICSI beavatkozás során.

A spermiumok különböző éretlenségi jeleinek és kromoszóma diszómiáinak sejten belüli kapcsolata nem teljesen ismert, a spermiumok morfometriai és kromoszóma

számbeli összefüggéseinek ismerete is hiányos, ezért az értekezésemet megalapozó kutató munkám során a következő kérdéseket vizsgáltam:

1. A diszómiák, ami a meiótikus nondiszjunkció következményei és a perzisztáló hisztonok jelenléte, ami nukleoprotein csere zavara között van-e intracelluláris kapcsolat? Van-e összefüggés a nukleoprotein éretlenség mértéke és az aneuploidia valószínűsége között?
2. A különböző nukleáris és citoplazmatikus érési zavarok ugyanazon sejtek vizsgálata kapcsán mutatnak-e korrelációt? Ha ezek az abnormalitások együttesen vannak jelen ugyanabban a spermiumban van-e összefüggés az elváltozások mértékében?
3. Van-e morfometriai különbség az aneuploid és haploid kromoszóma struktúrájú spermiumok között? Van-e lehetőség haploid sejtek szelekciójára morfometriai adatok segítségével ICSI során?

2. Anyag és módszer

A vizsgálatokra a Debreceni Egyetem Szülészeti és Nőgyógyászati klinikája és a YALE egyetem (New Haven, Connecticut, USA) Szülészeti és Nőgyógyászati Intézetének kollaborációjaként volt lehetőségem.

Az első kísérletben 7 enyhén oligospermiás férfi mintáját használtuk. Azért választottunk oligospermiás alanyokat, mert összefüggés van az emelkedett aneuploidia frekvencia és az alacsony spermium koncentráció között. A spermium koncentráció és motilitás CASA módszerrel való meghatározása után salin-imidazolos mosást végeztük, majd keneteket készítettünk. A kenetet először 5% ecetsavas AB-val megfestettük, majd mindenegyes férfinál legalább 600x nagyítással 8000 spermium nukleoprotein státuszát értékeltük. A spermiumokat, a nukleoprotein státuszt, és a mikroszkópos látótereket képileg rögzítettük. A sejteket a festés intenzitásának megfelelően értékeltük, ami a perzisztáló hisztonok mennyiségére utalóan "világos" (érett), "intermedier" (közepesen éretlen), és "sötét" (éretlen) spermiumok lehettek. A mikroszkópos területek lokalizációja és relokalizációját a mikroszkópos koordináták alapján történt, de a meghatározást segítette a

tárgylemezen levő gyémánt ceruzával bekarcolt vonalak. A spermiumok értékelése és a mikroszkópos területek rögzítése után az AB festéket 5%-os ecetsavas oldattal vontuk ki. Ezt követően multicolor FISH vizsgálat következett. A FISH eljárás előtt a spermiumok kondenzált állapotban levő kromatin állományát a DNS szonda számára hozzáférhetővé tettük: először ditiotreitollal (DTT, dekondenzáció), majd lítium sóval (LIS, duzzasztás) kezeltünk. A dekondenzációs eljárás után direkt jelölésű centromérikus próbát használtunk az X kromoszóma (Spektrum Zöld) és az Y kromoszóma (Spektrum Narancs) megjelölésére. A 17-es kromoszóma hibridizációja indirekt, biotinnal jelölt centromérikus szondával történt, amit avidin-rodaminnal és avidin-fluorescens izotiocianáttal (FITC) segítségével tettünk láthatóvá. A sejtmagokat 4,6 diamidino-2-phenylindollal (DAPI) festettük.
A FISH-t követően relokalizáltuk a korábban AB-val festett és a nukleoprotein érettség szempontjából már értékelt sejteket, majd meghatároztuk ugyanazon sejtek kromoszóma szerkezetét, külön jelölve a diszómia fajtákat 1717, XX, YY, XY és a diploidiákat. A kromoszóma szerkezet meghatározásakor az irodalomban elfogadott szigorú értékelési rendszert használtuk. Részben ennek megfelelően a nulliszómiákat figyelmen kívül hagytuk.

A második kísérletben ugyanazon spermiumok kettős jelölése történt perzisztáló hisztonokra, többlet citoplazma igazolására, apoptotikus folyamatok kimutatására és DNS fragmentációra. Ebben a tanulmányban oligospermiás és alacsony sejtszámú normospermiás férfiak mintáit használtunk, hogy minél nagyobb számban tudjunk értékelni éretlen sejteket. A vizsgálatban 13 férfi (átlagos spermium koncentráció: $25.0 \pm 6.2 \times 10^6$ spermium/ml, motilitás: 36.2 ± 6.5 %) mintáinak felhasználásával mintegy 5600 spermiumot értékeltünk egymást követő kettős festéssel.
A tanulmány több részből állt, melyek során két-két biokémia markert alkalmaztunk egymást követően ugyannál a spermiumnál az alábbi kísérleti modellek szerint. Spermium keneteket készítettünk tárgylemezre, majd 5%-os ecetsavas AB-val megfestettük. Az egyes spermiumok AB intenzitását és a mikroszkópos spermium területek képeit rögzítettük a Metamorph™ imaging program segítségével. A mikroszkópos asztal X-Y koordinátáit rögzítettük, a későbbi relokalizáció céljából. A spermium mintákból az AB festéket olyan oldószerek segítségével távolítottuk el

melyek az ezt követő, második festés fixálószerének elemei voltak (metanol az ISNT esetén, paraformaldehid az immuncitokémiai vizsgálatokban). Ezt követően a spermiumokat egy második biokémia próbával jelöltük: (I) CK immuncitokémia az immaturus sejtek citoplazmatikus retenciójának kimutatására; (II) DNS szál fragmentációjának kimutatására ISNT; és (III) caspase-3 immunfestés az apoptotikus folyamatok detektálására. A második marker festés után a korábbi AB festés során rögzített X-Y koordináták alapján relokalizáltuk a megfelelő mikroszkópos spermium területeket, majd a megfelelő képeket egymással összehasonlítva meghatároztuk a kettős próba mintázatait.

A spermiumok CK immuncitokémiája: Az AB festéket 0.5% paraformaldehidos PBS-vel mostuk ki, majd bovin szérum albuminnal (BSA) blokkoltunk. Ezt követően a spermiumokra poliklonális anti-CK-t rétegeztünk és a tárgylemezeket biotinilált anti-nyúl másodlagos antitesttel kezeltünk, majd avidin konjugált torma peroxidázt adtunk hozzá. Az tárgylemezeket diaminobenzidinnel és hidrogén peroxiddal kezeltünk tovább. A képződő barna szín alapján felismerhetővé váltak a citoplazmatikus retenciót mutató sejteket. Ebben a vizsgálatban 1284 spermiumot tanulmányoztunk (négy férfi, koncentráció: $10.9 \pm 2.2 \times 10^6$ /ml, motilitás: $32.5 \pm 4.8\%$).

Spermium immunfestés caspase-3-ra: Az AB festék kioldása hasonlóan történt, mint CK immuncitokémiánál, majd a spermiumokat BSA blokkoló oldattal, majd aktív caspase-3 antitesttel kezeltük. Ezt követően a tárgylemezeket biotinilált anti-nyúl másodlagos antitesttel kezeltük. Az ABC alapján képződött barna szín a caspase-3 tartalmat reprezentálta. Ebben a vizsgálatban 2101 spermiumot értékeltünk (4 férfi, spermium koncentráció: $11.9 \pm 1.4 \times 10^6$ spermium/ml, motilitás: $34.0 \pm 6.6\%$).

DNS integritás értékelése ISNT-val: A vizsgálat alapkoncepciója az, hogy DNS polimeráz enzim nukleotidok beépítésével javítja a DNS szálszakadást. A javító elemek egyike a biotin-jelölt dUTP horgonyként szolgál avidinhez konjugált torma peroxidáz számára. Ezért a teszt után, a torma peroxidáz generált szín arányos a spermiumokban levő DNS szakadás és javítás mértékével. Az AB kivonása metanollal történt. A tárgylemezeket ezt követően metanol-jégecetsav (3:1) keverékével fixáltuk, majd dekondenzációs kezelést végeztük DTT-vel, majd LIS-vel. PBS mosással folytattuk, majd biotinnal blokkoltuk, újabb mosás után avidinnal blokkoltunk Ezt követően a tárgylemezt DTT-ben kezeltük és hozzáadtuk a javító

elemek biotin-16-dUTP, dGTP, dCTP, dATP keverékét és a DNA polimeráz I enzimet. A biotinnal jelölt nukleotidák detektálása avidin-biotin torma peroxidáz módszerrel történt. Újabb mosás után a tárgylemezeket 3, 3-diaminobenzidine oldattal és hidrogén peroxiddal kezeltük. Ezt követően Coomassie Blue-val festettük, hogy optimálisan láthassuk a spermium kontúrokat. Ebben a vizsgálatban 2446 spermiumot értékeltünk (5 férfi, spermium koncentráció: 17.6 ± 1.1 x 10^6 spermium/ml, motilitás: 38.4 ±5.9%).

A spermium morfológia értékelése: A beszáradt spermium keneteket Diff-Quik-kel festettük meg a gyártó utasításainak megfelelően. A keneteket két vizsgáló egymástól függetlenül Tygerberg kritériumoknak megfelelően értékelte. Az eredményeket átlagoltuk tárgylemezenként.

FISH és objektív morfometriai kísérlet: Az első csoportot alkotó hat férfiből, akik mintáit kizárólag ebben a tanulmányban használtuk három oligospermiás volt (spermium koncentráció 9.3 ± 2.3 X10^6 spermium/ml; motilitás 39.7% ± 5.5%), és három normospermiás (spermium koncentráció 46.5 ± 21.0 X 10^6 spermium/ml; motilitás 46.8% ± 4.6%). A hat férfi mindegyikétől mintegy 200 spermiumot natív nem dekondenzált állapotban (n = 1,227 összesen) Metamorph program segítségével digitalizáltunk, és a spermiumokat morfológiailag értékeltük. A lokalizáció-relokalizáció szempontjai hasonlóak voltak mint a korábban részletezett kísérleteknél. Az egyes sejtek mérése során a következő paramétereket határoztuk meg: fej területe, periméter, hosszú tengely, rövid tengely, farok hossz. Ezt követően a spermiumoknál FISH-t végeztünk. Relokalizációt követően meghatároztuk a morfometriai szempontból már értékelt spermiumok kromoszóma szerkezetét, mely lehetett X vagy Y hordozó haploid vagy XX, XY, YY diszómiát tartalmazó.

Ennek a kísérletnek a második részében újrahasznosítottunk két korábbi tanulmányból 12 férfi (koncentráció 24 ± 2.5 x 10^6 spermium/ml; motilitás 52.5% ± 2.5%) FISH utáni mintáit (Kovanci és mtsai, 2001 és Jakab és mtsai., 2005), hogy nagyobb számú diszómiás dekondenzált spermiumot vizsgálhassunk. Összesen 178 kromoszóma diszómiás spermium képét találtuk (75 XX, 63 XY, és 40 YY).

A kísérletek statisztikai analízise

Az első kísérletben a nukleoprotein immaturitás szerinti érett és közepesen érett sejtek és az aneuploidia frekvencia közötti összefüggésnek vizsgálatát Mann-Whitney U teszttel végeztük. Az ugyanabban a spermium mintában a közepesen érett sejtek és a diszómiás gyakoriságának összefüggését Pearson korrelációs teszttel vizsgáltuk.
A második kísérletben, ahol a spermiumok kettős jelölését végeztük AB, CK és ISNT-ra a különböző csoportok közötti különbség összehasonlítására egy szempontos variancia analízist (ANOVA) használtunk normális eloszlásnál, és egy szempontos variancia analízist ANOVA ranks tesztet (Kruskal-Wallis), ahol a változók nem mutattak normális eloszlást. Ezt követően ANOVA Dunn's post hoc tesztet végeztünk. Az analízist Sigma-Stat 2.0. segítségével végeztük. Az egy spermiumban levő marker párok egyezésének összehasonlítására súlyozott kappa analízist kvadratikus súlyozással végeztünk. A kappa =0.8, ami nagyon magas szintű egyezést jelent.
A dimenzió tanulmányban a haploid és diszómiás sejtek dimenzió különbségeinek vizsgálatára szignifikancia meghatározására Mann-Whitney U test, Student féle t tesztet és Tukey post hoc tesztet használtunk. A szignifikancia szintet $P<.05$-ben határoztuk meg.

3. Eredmények és diszkusszió

Anilinkék és FISH tanulmány: Hét közepesen oligospermiás férfi mintáját felhasználva összesen 58,793 spermiumot értékeltünk. Nukleáris érettség tekintetében AB festéssel az érett, közepesen éretlen és az éretlen sejtek aránya a következő volt 73.1±2.3%, 21.8±2.1% és 5.0±0.5%. FISH-vel az átlag kromoszóma diszómia frekvencia a következő volt: X diszómia: 0.07±0.01%, Y diszómia: 0.09±0.02%; XY diszómia: 0.18± 0.03%, és 17diszómia: 0.16±0.03%. A diploidia frekvencia 0.17 ± 0.04% volt.
Az AB intenzitás alapján közepesen éretlen sejtekben mind a négyféle diszómia forma gyakoribb volt, mint az érett sejtekben. X diszómia esetén 3.9x nagyobb volt a gyakoriság, Y diszómia esetén 5.2x, XY diszómia esetén 6.1x és 17 diszómia esetén

4.5x, az összesített diszómia frekvencia esetén ugyanez 5.3x (az X diszómia kivételével valamennyi csoportban $P<0.001$). Nagyobb volt a közepesen éretlen "intermedier"sejtek között a diploidia incidenciája is az érett, AB-vel világos sejtekhez viszonyítva, de ez a különbség nem volt szignifikáns.

A hipotézisünket, hogy a spermiumokban előforduló diszómia gyakoriság és az AB sajátosság között kapcsolat van igazolták a korrelációs vizsgálatok is. Pearson-féle korrelációs tesztel ugyanabban a mintában egyes diszómiák és az AB-val közepesen éretlen sejtek előfordulási gyakorisága között szoros összefüggést találtunk: XY diszómia ($r=0.82$, $P<0.05$), 17 diszómia ($r=0.70$, $P< 0.05$), és az összesített diszómia ($r=0.76$, $P<0.05$)**.** Eredményeink megerősítették a HspA2 központi szerepéről kialakított elképzelésünkről

Bár enyhe emelkedés volt a diploidiák gyakoriságában a közepesen éretlen sejtek között, az érett sejtekhez viszonyítva, de ez nem közelítette a diszómiáknál talált kapcsolatot, igazolva, hogy a diploidiák egészen más mechanizmus alapján alakulnak ki, mint a diszómiák.

A legérdekesebb és nem várt eredménye ennek a kísérletnek az volt, hogy a legéretlenebb, AB festéssel sötét, tehát nagy mennyiségű perzisztáló szomatikus hisztont tartalmazó sejtek nem mutattak FISH szignált, és néha DAPI magfestés is hiányzott. Mi két lehetséges mechanizmust tudunk elképzelni, hogy miért hiányzott a FISH jel: 1) A HspA2 alacsony expressziója a hiszton-protamin csere zavara mellett a DNS reparáló enzim zavarát okozza, ezért sérül a DNS integritás 2) Az éretlen spermiumok citoplazmatikus retencióval és nagyobb ROS produkciója okozza a DNS lánc degradációját A fragmentált DNS-t a szekunder helikális struktúra helyben tartja még az intakt spermiumban. A FISH-hez szüksége dekondenzációt és denaturációt követően azonban a DNS fragmentumok kiszabadulnak a spermiumból.
A perzisztáló hisztonok és a kromoszómák diszómiák előfordulása közötti szoros kapcsolat alátámasztja ezeknek a zavaroknak a közös eredetére vonatkozó feltételezésünket: oka a HspA2 alacsony expressziója, ami a spermiogenetikus és meiótikus zavarhoz vezet egyidejűleg. A kísérleti eredményeink arra is utalnak, hogy a legéretlenebb spermiumoknál a korábban részletezett mechanizmus alapján

elveszhetnek a FISH szignálok. Ezért feltételezhető, hogy oligospermiás férfiak mintáiban ahol az éretlen sejtek száma nagy a diszómia frekvencia száma alulértékelt.

Spermiumok többes marker jelölése AB festéssel, Caspase-3 immunfestéssel, CK immuncitokémiával, és ISNT-val A kísérletben 13 férfi (átlag spermium koncentráció: 25.0 ± 6.2 x 10^6/ ml, motilitás: 36.2 ± 6.5%) mintegy 5600 sejtjét értékeltünk kettős biokémiai jelölésével.

A kísérlet **első részében** a spermiumok nukleoprotein státuszát és a sejtplazma éretlenségét vizsgáltuk. Először AB festést használtunk, hogy megjelöljük a perzisztáló hisztonokat, majd CK immuncitokémiával a sejtplazma éretlenségét vizsgáltuk. Nagyfokú egyezés volt az AB és CK markerekkel végzett kettős festés mintázata között. A spermiumok legnagyobb része a (83%) megegyező festési mintát világos-világos (mintegy 40%), intermedier-intermedier (mintegy 25%) és sötét-sötét (mintegy 18%) mutattak. A heterogén intermedier-világos vagy intermedier-sötét mintázat megjelenése kb. 18% volt, míg a diszkordáns festési eredményű világos-sötét és sötét-világos mintázatú spermiumok aránya kevesebb, mint 1% volt.

A kísérlet **második részében** a spermiumokat először AB-val festettük, majd ISNT jelöltük. Összesen 2446 spermiumot tanulmányoztunk így. A legnagyobb része (84%) a spermiumoknak hasonló festési mintát mutatott mindkét módszerrel világos-világos (n=1261, 52%), intermedier-intermedier (n= 498, 20%), sötét-sötét (n = 291, 12%). Spermiumok heterogén festéssel világos - intermedier, sötét - intermedier, 15%-ban voltak jelen, míg a diszkordáns világos-sötét és sötét-világos sejtek gyakorisága 1.2% volt. Mint az AB-CK esetében, a spermiumok 84%-ban a festési mintázat identikus volt az AB és DNS fragmentáció viszonylatában. Ezért elmondható, hogy az éretlen spermiumok perzisztáló hisztonokkal szintén nagymértékben mutatnak DNS fragmentációt.

A **harmadik részében ennek** a kísérletnek 2101 spermiumot vizsgáltunk AB és caspase-3 immunfestéses kettős marker vizsgálattal. Világos-világos festés volt 1047 (50%) spermiumnál, intermedier-intermedier mintázat 483 (23%) spermiumnál és sötét-sötét mintázat 261 (12%) sejtnél. Akárcsak más citoplazmatikus és nukleáris

markerrel a spermiumok mintegy 85%-a a kettős próba vizsgálat során megegyező festési mintát mutatott AB-val és apoptotikus markerrel. Hasonlóan a többi markerhez az intermedier-világos vagy az intermedier-sötét spermiumfestés a sejtek körülbelül 14%-ban jelentkezett, és a diszkordáns sötét-világos és a világos-sötét festési mintázat kevesebb, mint 1.0 %-ban.

A Tygerberg normál morfológia és AB festés intenzitása közötti kapcsolatot 5 minta kapcsán a tanulmányoztuk, melyben mindenegyes betegnél értékeltünk legalább 400 spermiumot (n = 3882 összesen, két független vizsgáló által értékelve). Az érett, AB-val világos festődést mutató, közepesen éretlen, intermedier és a éretlen, sötét csoportokon belül a Tygerberg normális sejtek aránya 9.5 ± 1.3, 2.3 ± 0.9 és 0.5 ± 0.3% volt. Jelentős különbség volt a világos és az intermedier ($P< 0.05$), és az intermedier és sötét csoportok között ($P< 0.01$). Ez alapján kijelenthetjük, hogy kapcsolat van különböző mértékű biokémiai próbákkal éretlenséget mutató spermiumok csoportja között a Tygerberg morfológiában.

Interindividuális variáció: A négy férfi esetében akiknek spermiumainak vizsgálatánál AB festés - CK immuncitokémia kombinációját alkalmaztunk, a világos-világos spermiumok aránya 36.0 ± 4.4% (átlag ± SEM) volt, adott egyedeknél 34.4, 30.3, 30.4 és 48.9%, az intermedier-intermedier festés átlaga 24.9 ± 4.1% (25.8, 15.8, 35.4 és 22.8%), míg a spermiumok sötét- sötét mintázata 21.1 ±5.9% volt jelen (28.7, 33.3, 12.7 és 9.5%). Az 5 férfinél, akiknek spermiumait AB-ISNT-val vizsgáltuk, az átlag világos-világos mintázat 52.0 ± 6.7% (54.8, 66.4, 32.9. 55.2 és 50.8%) volt, míg az átlag intermedier-intermedier mintázat 19.7 ± 1.9% (20.6, 16.6, 25.9, 20.5 és 15.0%) volt. A sötét- sötét mintázat 12.2 ± 1.7% (12.5, 7.2, 16.1, 9.8 és 15.4%). Végül annál a négy férfinél, ahol a spermiumok AB-caspase-3 kettős festéssel jelöltük, a világos-világos spermiumok aránya 49.4 ± 6.7% (44.5, 56.7, 33.2 és 63.3 %): az intermedier-intermedier festődést mutató spermiumoké 23.3 ± 3.5 (30.3, 26.4, 20.9 és 14.4%); míg a sötét- sötét spermiumok 12.7 ± 5.5% (11.3, 3.5, 28.3 és 7.6%)-ban voltak jelen.

A festési mintázat konzisztensen nagyfokú egyezése (83-85%-os egyezés) az érett, a közepesen éretlen és az éretlen sejteken belül azt mutatja, hogy a citoplazma retenció, DNS lánc fragmentáció és az apoptózis egyaránt kapcsolatban van a perzisztáló hisztonokkal. Ezt a kapcsolatot a különböző nukleáris és citoplazmatikus próbák között regresszió analízissel vizsgáltuk. Nagyon szoros kapcsolatot találtunk az éretlenség különböző jeleinek intracelluláris egyezése kapcsán (kappa index = 0.8). Ezért úgy gondoljuk, hogy individuális sejteknek kettős jelölése nagyon szenzitív módszere az érett és az éretlen sejtek arányának meghatározására adott spermium mintában.

A fentiek alapján elmondható, hogy ugyanazon a spermiumon végzett kombinált objektív biokémiai marker vizsgálatok igazolták, hogy a különféle, nukleáris és celluláris éretlenségi jellegzetességek egymással kapcsoltan jelennek meg ugyanabban sejtben. A kolokalizáció mellett az elváltozások mértéke is nagyfokú egyezést mutat. Mindezen eredményeink az HspA2 teóriát, a chaperon protein központi szerepét az ivarsejtérésben játszott szerepét támasztják alá, a közös ok az alacsony HspA2 expresszió érési zavarok kombinációját okozza. Ugyanakkor bizonyos mértékű heterogenitás is észlelhető volt (heterogenitás 14-18%), ami részben megfelel a spermiumoknál már korábban is leírt polimorf jellegzetességgel. Másrészt azért fontos ismeret, mert azt mutatja, hogy a spermium éretlenségét egy biokémiai próbával nem lehet teljes pontossággal megállapítani. Ez utóbbi megállapítás ellenére is elmondhatjuk, hogy a gyors anilinkék teszt egy egyszerű és nagyon megbízható vizsgálat a spermiumok éretlenségének megállapítására. Mindezek mellett a különböző éretlenségi jelek, illetve az alapul szolgáló érési zavarok egy sejten belüli megjelenésének ismerete ezért is fontos, mert ez alapján megérthetjük, hogy a gyógyszeres terápia a férfi infertilitásban sokszor mennyire korlátozott. Például az irodalomban gyakran említett antioxidáns terápia lehet effektív a DNS törések megelőzése viszonylatában, de az egyidejűleg jelenlevő nukleoprotein éretlenséget vagy citoplazma retenciót és azok következményeit nem képes kezelni, akárcsak a membrán éretlenségből következő problémákat.

Ebben a kísérletben igazoltuk, hogy a spermium morfológia és a biokémia markerek eredményei egymással korrelációban vannak. A spermium morfológiája

nagymértékben függ azoktól a fehérjéktől, melyek összeszerelését és transzportját az HspA2 irányítja, akárcsak a nukleoprotein cseréjét, amihez viszonyítottuk. Ezt a feltételezett kapcsolatot igazoltuk. A leginkább a spermiogenetikus zavarra utaló morfológiai jellemzők a nagyobb fej, abaxiális farok eredés, rövidebb farok.

Haploid és. Diszómiás spermiumok dimenzió vizsgálata

Az morfometriai összehasonlítás első része haploid és diszómiás natív, nem dekondenzált spermiumokon 1,227 illetve 24 sejten alapult. Vizsgálataink során 6,000 spermiumot elemeztünk FISH-vel, hogy találjuk 1,251 morfometrikusan értékelhető spermiumot. A 24 diszómiás mag (9, 10, és 5 spermium - XX, XY és YY diszómia), ami 0.15%, 0.16%, és 0.08% gyakoriságot jelentett (összesítve 0.39% a szex kromoszóma diszómia). Ez a megjelenési gyakoriság megegyezik a saját laborunk korábbi, valamint más laborok publikált adataival.

A natív, nem dekondenzált spermiumok vizsgálatánál a haploid sejtekhez képes a diszómiás sejtek fejének területe átlaga nagyobb volt 16,6± 0.1 μm^2 vs. 21, 9± 1.8 μm^2, ami 30% különbség, ugyancsak nagy volt a differencia a periméter és a rövid tengely átlagát vizsgálva (16.2 ± 0.1 vs. 18.3 ± 0.7 μm; 3.80 ± 0.01 vs. 4.63 ± 0.2 μm). Mind a három különbség erősen szignifikáns volt ($P<0,001$). Kisebb szignifikancia szinten, de különbség volt a hosszú tengely és az elliptikus faktor esetében. Ahhoz, hogy spermium szelekció szempontból hasznos következtetéseket le tudjunk vonni a sejtek méretbeli eloszlást is vizsgálnunk kellett. Ez utóbbi vizsgálathoz két korábbi tanulmány dekondenzáció/FISH utáni spermiumok morfometriai adatait is felhasználtuk (178 diszómiás sejt). A fej területében és a rövid tengely hosszában itt is jelentős különbség volt 30.9 ± 0.3 μm^2vs 34.2 ± 0.9 μm^2; 6.41 ± 0.03 μm vs 6.77 ± 0.08 μm, bár a periméterben nem volt különbség. A részletes méretbeli eloszlásnak vizsgálatakor jelentős 70 % átfedés volt a két spermium populáció, haploid-diszómiás között. Bár a diszómiás sejtek átlagátmérője nagyobb, de ugyanúgy megtalálhatóak voltak a mikrokefál spermiumok között is Tehát adataink a spermium szelekció szempontjából inkonzisztensek. Morfometriai eredmények a szelekció biztonságosságát nem tudják növelni.

Ezen kívül vizsgáltuk a méretbeli különbségeket az YY, XX, és XY diszómia fajták között. A dekondenzált spermium populációban 40, 75, és 63 diszómiás spermiumok eredményeit vizsgáltuk és vizsgáltuk a méretkülönbségek a három diszómiák fajta között. Feltételezve, hogy a kromoszóma tömeg játszik szerepet a spermium fej méretében, azt lehetne feltételezni, hogy az XX magoknak kellene a legnagyobbnak lenni, melyet az XY spermiumok követnek, majd a YY-hordozó spermiumok. Mégis, mind a négyféle fejet jellemző paraméterben az YY-hordozó spermiumok mintegy 10% (6%–12%) nagyobbak voltak az XY és XX spermiumok mérténél, amelyek viszont hasonlóak voltak egymáshoz. Ezért azt lehet feltételezni, hogy a diszómiás sejtek méret különbségei elsősorban az éretlenséghez, citoplazma retencióhoz köthetőek, illetve a dekondenzáció folyamán alakulhatnak ki, és nem a kromoszóma tömeghez kötött. Ezt az észrevételt alátámasztotta az az eredmény is, hogy a spermium érettségi marker a farok hossz/fej hosszú tengely aránya a diszómiás sejteknél szignifikánsan kisebb volt haploid spermiumokhoz képest (nem dekondenzált spermiumban 7.9±0.3 vs. 8.8±0.04; dekondenzált spermiumban 7.4±0.13 vs. 8.0±0.06 (P=.02 és .005). Ez a plazmamembrán éretlensége miatti nagyobb fokú dekondenzációs fejterület növekedés következménye elsősorban.

Konklúzió

1 A diszómia első sorban a közepesen éretlen sejtekben jelenik meg, mintegy 4-6X gyakrabban, mint az érett sejtekben (P<.001). Szintén szoros korreláció van a közepesen éretlen sejtek gyakorisága és a diszómiák előfordulási aránya között ugyanabban a spermium mintában. (r=0.60, P=.002). Ezek az eredmények alátámasztják azt az elképzelésünket, hogy a HspA2 alacsony expressziója meiótikus non diszjunkciót és a spermiogenezis zavarait okozza ugyanabban a sejtben. Meglepő módon a nukleoprotein csere szempontjából legéretlenebb spermiumokban nem kaptunk FISH szignált. A legvalószínűbb, hogy a DNS az emelkedett ROS és apoptotikus folyamatok miatt fragmentálódik, és a fragmentálódott DNS a FISH technika során kiszabadul a sejtekből. Ezért feltételezhető, hogy azokban a mintákban ahol nagy az éretlen sejtek aránya a diszómiák frekvenciája nagyobb, mint korábban hitték.

2 A nukleáris kompartment éretlenségi jellegzetessége, a perzisztáló hisztonok, és a citoplazma érési rendellenessége, a citoplazma retenció, valamint az apoptózis és a DNS fragmentáció elsősorban ugyanazon spermiumokban detektálhatóak Az elváltozások mértéke szintén megegyező az esetek jelentős részében. Az elváltozások kolokalizációja és hasonló mértéke statisztikailag is nagyfokú szignifikanciát mutat (kappa = 0,8). A spermiumok biokémiai immaturitása összefüggést mutat a spermium morfológiájával is. Mindezek az eredmények igazolják a HspA2 központi szerepét a spermiogenezisben. A sejtek között heterogenitás is előfordul mintegy 14-18 %-ban, ami megegyezik a spermiumoknál már korábban ismert polimorfikus jelenséggel. Oka az, hogy a spermium az érési zavart szenvedő lépés után még többféle módon alakulhat tovább a sejt. A diszkordáns festési mintázat elhanyagolható mértékben volt jelen.

3 A morfometriai eredményeink alapján elmondható, hogy a diszómiás sejtek fejének paraméterei nagyobbak a haploid sejtek hasonló eredményeinél, fej területe, rövid tengely, periméter; a különbség erősen szignifikáns. Az eloszlás elemzésénél az eredmények nem konzisztensek, jelentős átfedés van a két spermium populáció között, és annak ellenére, hogy a diszómiás magok átlag

értékei nagyobbak, diszómiás sejteket találtunk a mikrokefál sejtek között is. Ezek alapján spermium szelekció morfometriai eredmények segítségével nem nyújt biztonságot az ICSI-ben.

Saját publikációk jegyzéke

Az értekezéshez felhasznált közlemények

1. **Óvári L.**, L. Sati L., Vigue L., Stronk J., Borsos A., Ward D.C., and Huszar G. (2009) Double probing individual human spermatozoa: aniline blue persistent histones and fluorescence in situ hybridization for aneuploidies *Fertility and Sterility*, article in press **IF: 3.184 (JCR 2007)**

2. Sati L, **Óvári L**, Bennett D, Simon SD, Demir R and Huszar G (2008) Double probing of human spermatozoa for persistent histones, surplus cytoplasm, apoptosis and DNA fragmentation. *Reprod Biomedicine Online* **16**,570-579. **IF: 2.840 (JCR 2007)**

3. Zavaczki Z., Celik-Ozenci C., **Óvári L**., Jakab A, Sati GL, Ward DC and Huszar G (2006) Dimensional assessment of X-bearing and Y-bearing haploid and disomic human sperm with the use of fluorescence in situ hybridization and objective morphometry. *Fertility and Sterility* **85**,121-127. **IF: 3.277 (JCR 2006)**

4. Cayli S., Jakab A., **Óvári L**., Delpiano E., Celik-Ozenci C. Sakkas D., Ward D., Huszar G (2003) Biochemical markers of sperm function: male fertility and sperm selection for ICSI. *Reprod Biomed Online***7,**462-468.

Az értekezés témájában megjelent idézhető absztraktok

1. L.G. Sati**, L. Óvári**, R. Demir, D.C. Ward, P. Bray-Ward, G. Huszar (2004) Persistent Histones in Immature Sperm are Associated with DNA Fragmentation and Affect Paternal Contribution of Sperm: A Study of Aniline Blue Staining, Fluorescence In Situ Hybridization (FISH) and DNA Nick

Translation. American Society for Reproductive Medicine (ASRM) 60th Annual Meeting Abstract Book O-129,S 52.

2. Zavaczki, Z., **Óvári** L., C. Celik-Ozenci, Szöllősi J., D. Ward, and Huszar G. (2002) The dimensions of X- and Y-bearing human sperm are not different: a study of objective morphometry and FISH. 28th Annual Meeting of the American Society of Andrology and XVIIth Testis Workshop; Abstract 78

3. **Óvári L**, Vigue L, Stronk J, Borsos A, Ward D, Ward P and Huszar G (2003) Detection of numerical chromosomal aberrations and nuclear immaturity within in the same spermatozoa: a study of FISH and Aniline blue staining. *Hum Reprod* **18** (Suppl 1), p. xviii, 79

Egyéb, az értekezéshez fel nem használt közlemények

1. **Óvári L.**, Aranyosi J., Balla Gy. (2009) Acute effect of cigarette smoking on placental circulation - a study by carbon-monoxide measurement and Doppler assessment *Acta Physiologica* **96**,243-251. **IF: 0.453 (JCR 2007)**

2. Jakab A. Jr, **Óvári L**., Juhász B., Birinyi L., Bacskó G., Tóth Z. (2002) Ultrasound diagnosis of focal intrauterine lesions *Orv Hetil* **143**,1739-43.

3. Jakab A Jr., **Óvári L**., Juhász B., Birinyi L., Bacskó G., Tóth Z. (2005) Detection of feeding artery improves the ultrasound diagnosis of endometrial polyps in asymptomatic patients. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* **119,**103-107 **IF: 1.141 (JCR 2005)**

4. Aranyosi J, Bettenbuk P., Zatik J., **Óvári L**., Török I., Gödény S. (2001) Doppler evaluation of the fetal arterial circulation: reference values of the Resistance Index and Pulsatility Index between the 28th and 41st weeks of gestation *Orv Hetil* **26**,1847-1850.

A tézissel kapcsolatban felhasznált közlemények impakt faktora összesítve:
9.301

Egyéb közlemények impakt faktora összesítve:
1,594

Könyvfejezetek:

Óvári L.: Postpartum sonographia, In: Tóth Z.-Papp Z. (szerk) Szülészet-Nőgyógyászati Ultrahang-Diagnosztika Szerkesztette: White Golden Book Kft, Budapest, 2002

Óvári L.: Postpartum sonographia, In: Tóth Z.-Papp Z. (szerk) Szülészet-Nőgyógyászati Ultrahang-Diagnosztika második kiadás Szerkesztette: White Golden Book Kft, Budapest, 2006

Egyéb előadások jegyzéke

Tóth Z., **Óvári L**., Jakab A., Juhász B., Ditrói P., Mező T., Kovács T., Török O.: Prognostic value of reduced first trimester ultrasound parameters
Ultrasound in obstetrics &Gynaecology 1995; 6 S2:115

Ditrói P., Kóródi I., Jakab A., Juhász B., **Óvári L.**, Tóth Z.: Differentional diagnostic problems of ectopic pregnancy
Ultrasound in obstetrics &Gynaecology 1996; 8 S1:147

Jakab A., **Óvári L**.,Juhász B., Tóth Z.: The influence of age and hormon replacement on endometrioal thickness and subendometrial vascularisation int he menopause detected by transvaginal B-mode and power doppler ultrasound
Ultrasound in obstetrics &Gynaecology 1996; 8 S1:198

Juhász B.,Jakab A., **Óvári L**., Tóth Z.: Cycle-monitoring by combination of power doppler imaging(PDI) with endocrine studies
European journal of ultrasound 1996; 4:S77

Óvári L., Major T., Jakab A., Juhász B., Tóth Z.: The role of ultrasonographyin the management of pelvic cystic masses in adolescent age Ultrasound in obstetrics and gynaecology 1996; 8(S1): 148

Óvári L., Major T., Jakab A., Juhász B., Tóth Z.:How could help ultrasonography in the management of plevic cystic masses in adolescent age
European journal of ultrassound 1996; 5: S73.

Tóth Z., Juhász B., **Óvári L**., Jakab A., Ditrói P., Török O., Zatik J.: The significance of transvaginal ultrasound and ultrasound-guided transvaginal aspiration int he diagnosis and treatment of tuboovarian abscessess
Ultrasound in obstetrics and gynaecology 1996; 8(S1): 183

Zatik J., Jakab A., **Óvári L**., Juhász B., Tóth Z.: The effect of estrogen-gestogen replacement in the menopause ont he uterine perfusion detected by transvaginal colour doppler
Ultrasound in obstetrics and gynaecology 1996; 8(S1): 169

Jakab A., **Óvári L**.,Juhász B., Balogh Á., Tóth Z.: Effect of age and HRT on uterine environment in the menopause: an ultrasound study
Acta obstet. Gynecol Scand. 1997;76:P76.5.

MezőT., Jakab A., **Óvári L**.,Juhász B., Tóth Z.: First trimester transvaginal ultrasound decreases the incidences of molar pregnancies
Cesko-slovenska Pediatrie 1997;7: 478

Óvári L., Jakab A., Juhász B., Tóth Z.: Do first trimester subchorionic hematomas affect the ongoing pregnancies
Cesko-slovenska Pediatrie 1997;7: 479

Tóth Z., Jakab A., **Óvári L.**, Juhász B., Ditrói P., Mező T., Kovács T., Török O.: Screening and prognostic value of reduced first trimester ultrasound parameters
Cesko-slovenska Pediatrie 1997;7: 478

Tóth Z., **Óvári L**., Jakab A., Török O.: Hysterocontrastsonography(HyCoSy) by Power Doppler Imaging
Ultrasound in obstetrics &Gynaecology 1998; 12S1:192

Jakab A., Juhász B., **Óvári L.**, Major T., Birinyi L., Bacskó Gy., Tóth Z.:Power Doppler Imaging in diagnosis of endometrial polyps - feeding vessels
Ultrasound in obstetrics &Gynaecology 1998; 12S1:15

Jakab A., **Óvári L**., Bodnár B., Borsos A., Tóth Z.: Uterine Perfusion during GnRh antagonist treatment for endometriosis
Gynecological endocrinology 1998; 12S2.

Óvári L., Aranyosi J., Major T., Mező T., Tóth Z.: Identification of fetal growth retardation and optimal timing of delivery by third trimester fetal blood flow examination
Fetal diagnosis and therapy 1998; 13S1: 75

Óvári L., Jakab A., Zatik J., Juhász B., Tóth Z.: Ultrasound guided aspiration of tuboovarian abscesses

Zatik J., Aranyosi J., Major T., **Óvári L**., Páll D., Fülesdi B.: Comparison of maternal middle cerbral artery blood flow velocity as measured in preeclamptic , healthy pregnant women by transcranial doppler sonography
International Journal of gynaecology and obstetrics 2000; 70 S1: 146

Jakab A., **Óvári L**., Juhász B., Birinyi L.,Bacskó Gy., Tóth Z.: Asymptomatic endometrial polyps can be detected by power Doppler ultrasound. Ultrasound Obstetrics Gynecol 2005; 26(4): 325-326

Jakab A., **Óvári L**., Juhász B., Birinyi L.,Bacskó Gy., Tóth Z.: Detection of feeding vessels improves the ultrasound diagnosis of endometrial polyps in asypmtomatic patients Eur J. of obstetrics Gynaecology Reprod Biol 2005; 79: 103-107

Scientometriai paraméterek

In extenso közlemények száma:	3
ebből elsőszerzős:	3
Összesített impact factor:	**4,695**
Független idézettségek száma:	5