

Egyetemi doktori (Ph.D.) értekezés tézisei

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

Mokánszki Attila

Témavezető: Prof. Dr. Oláh Éva



**DEBRECENI EGYETEM
Klinikai Orvostudományok Doktori Iskola**

Debrecen, 2013

Egyetemi doktori (Ph.D.) értekezés tézisei

**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

Az infertilitás hátterében álló genetikai eltérések vizsgálata és klinikai jelentősége

Értekezés a doktori (Ph.D.) fokozat megszerzése érdekében
a klinikai orvostudományok tudományágban

Írta: Mokánszki Attila okleveles molekuláris biológus

Készült a Debreceni Egyetem Klinikai orvostudományok doktori iskolája
(klinikai vizsgálatok programja) keretében

Témavezető: Prof. Dr. Oláh Éva

A doktori szigorlati bizottság:

elnök:	Prof. Dr. Berta András, az MTA doktora
tagok:	Prof. Dr. Biró Sándor, az MTA doktora Dr. Tóth András, Ph.D.

A doktori szigorlat időpontja: 2013. április 9. 11:00

Az értekezés bírálói:

Prof. Dr. Papp György, kandidátus
Dr. Kovács Tamás Szilveszter, Ph.D.

A bírálóbizottság:

elnök:	Prof. Dr. Berta András, az MTA doktora
tagok:	Prof. Dr. Biró Sándor, az MTA doktora Prof. Dr. Papp György, kandidátus Dr. Tóth András, Ph.D. Dr. Kovács Tamás Szilveszter, Ph.D.

Az értekezés védésének időpontja: 2013. április 9. 13:00, DE OEC Belgyógyászati Intézet, A
épület tanterem

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 prenatális vizsgálattal megelőzhetjük károsodott gyermek születését.

1.1. Az infertilitás meghatározása és előfordulási gyakorisága

Az infertilitás fogalomkörébe tartoznak a férfi és női eredetű meddőség különböző formái, valamint az ismétlődő vetélések, amennyiben ezek hátterében nem deríthető ki egyértelmű nőgyógyászati, vagy andrológiai tényező. Infertilitásról beszélünk, ha rendszeres, fogamzásgátlástól mentes házasság ellenére egy év alatt nem következik be terhesség. Ismétlődő vetelésről két, vagy több vetelés/magzati elhalás esetén beszélünk. A kutatási eredmények alapján megállapítható, hogy az infertilitás hátterében 40%-ban nőgyógyászati, 40%-ban andrológiai tényezők állnak, míg 20%-ban az okok mindkét félben kereshetők.

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 reprodukív életkorban lévő házaspárok esetén.

1.2. 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.

Kromoszóma eltérések

A kromoszóma-eltérések incidenciája 1:100, fele számbeli, fele szerkezeti eltérés, de előfordulhat a számbeli és szerkezeti eltérések együttes jelenléte is. 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.

A nemi kromoszóma rendellenességek a kromoszóma eltérések 80%-át teszik ki, nagy részük számbeli kromoszóma aberráció. 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%).

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.

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. Irodalmi adatok szerint az azoospermias férfiaknál gyakoribbak az Y kromoszóma mikrodeléciói, mint oligozoospermia esetén, gyakoriságuk a 15%-ot is elérheti. Az Y kromoszóma AZF (azoospermia faktor) régiója felelős a

spermatogenezisért, mely három alrégióra osztható: AZFa, AZFb és AZFc. 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.

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. 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. 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. 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.

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. Az *SRY* gén egy transzkripciósfaktort kódol, amely számos gén szabályozásában vesz részt. Az *SRY* gén az Y

kromoszómáról az X kromoszómára transzlokálódhat, 46,XX férfi szindrómát eredményezve. A szindróma prevalenciája 1:20000. Ezek a férfiak fenotípusosan normálisak, heréjük kisebb, a herecsatornák hialinizálódtak, nincs spermium képzésük, az FSH szint emelkedett, a tesztoszteron szint csökkent.

Génmutációk

A *Kallmann-szindróma* anozmiával vagy hipozmiával társult hipogonadotróp hipogonadizmus, melynek incidenciája 1:60000. A szindróma hátterében a hipotalamusz GnRH szekréciójának deficienciáját az X kromoszómához kötött *KAL1* gén mutációi okozzák. A mutáns gén kóros anozmin molekulát kódol, így a GnRH neuronok normális szinapszis képzése elmarad. A szindrómára a késői pubertás, magas termet, hipoplaziás here és pénisz, kriptorhizmus és a szaglás hiánya vagy csökkent volta jellemző.

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. 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).

A cisztás fibrózis az egyik leggyakoribb autoszomális recesszív öröklésmenetű kórkép, előfordulási gyakorisága 1:2500. A betegség hátterében a sejtmembrán klorid csatornait 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 $<5 \times 10^6/\text{ml}$). Magyarországon a $\Delta\text{-F508}$ mutáció mintegy 60%-ban áll a cisztás fibrózis hátterében. További gyakori mutációk az R117H, a 218delA, és a 1148T mutációk, de kettős (compound) heterozigóták is előfordulnak.

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.

A spermiumok genetikai eltérései

A spermiumsejtek nagyobb gyakorisággal tartalmaznak genetikai eltéréseket: kromoszóma aberrációkat, génmutációkat, mint a szomatikus sejtek. Ugyanakkor a spermiumok tanulmányozása egyrészt sokkal nehezebb, másrészt vizsgálatukkal csak az adott minta genetikai eltéréseiről kaphatunk információt. Az éretlen spermiumok aránya és a kromoszóma diszómia gyakorisága összefüggésben áll egymással, mivel a diszómia főleg az éretlen spermiumokra jellemző. Az éretlen spermiumok aránya csökken, ha a spermium koncentráció nő. 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. 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.

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

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.

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. 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.

Az 1980-as évekig heterospecifikus fekvendőség segítségével tanulmányozták a meiotikus szegregációt aranyhőrcsög petesejtet humán spermatozoával termékenyítve meg. A FISH bevezetésével lehetővé vált a spermiumsejtek kromoszóma állományának tanulmányozása.

1.3. 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. Az asszisztált reprodukciós eljárások során hormonkezelésre rosszul reagálók esetében is felmerül a genetikai tényező szerepe. A kromoszóma eltérés nélküli nők igen magas arányban képeznek kromoszómálisan kóros oocitákat. Előrehaladott anyai életkor esetén az oocitákat érintő genetikai eltérések gyakorisága nő, ezért asszisztált reprodukció előtt ajánlott a genetikai tanácsadás.

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 primer és szekunder amenorrhoeával vagy oligomenorrhoeával. A Turner-szindróma előfordulási aránya a primer amenorrhoeások között 30%-ra tehető. Az autoszomális strukturális abnormalitások ismételt vetéléseket eredményeznek.

Génmutációk

A fragilis X szindróma fiúk mentális retardációjának leggyakoribb oka, melyet az *FMR1* gén 1. exonjában lévő CGG trinukleotid repeatek expansziója 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. A POF jellemző tünetei az oligomenorrhoea és a magas gonadotropin szint. A premutációt hordozók az asszisztált reprodukciós eljárások során a hormonkezelésre rosszul reagálnak.

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.

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

2. 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 expanziójának 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

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: $4,8 \times 10^6/\text{ml}$; $0,1\text{-}14 \times 10^6/\text{ml}$) infertilis férfi spermium mintáit WHO kritériumok szerint osztályoztuk.

A spermium sejtek vizsgálata során 28 infertilis, normális kariotípusú férfi spermium mintáinak kromoszóma aberráció gyakoriságát és hialuronsav kötődési képességét tanulmányoztuk. 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. 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 expansziója 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.

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 mikrodeléció 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. 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.

3.2. Vizsgálati módszerek

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 leállítását 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 festékkel festettük. 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.

A FISH vizsgálathoz a kromoszómapreparálás során nyert sejtszuspenziót használtuk. 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 dehidrálás 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.

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.

Az Y kromoszóma AZF régiójának vizsgálata

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: 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: 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.

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.

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.

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. A lemezt 10 percig szobahőn hagytuk, mely szükséges a spermiumsejtek hialuronsavhoz való kötődéséhez.

Spermiumok FISH vizsgálata

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 eltérését 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. 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.

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.

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.

Az *FMR1* gén vizsgálata

Az *FMR1* gén 5' végén található CGG trinukleotid repeateket tartalmazó régiót polimeráz láncreakció (PCR) technikával amplifikáljuk az Amplidex™ *FMR1* PCR Kit (Asuragen, Austin, TX, USA) segítségével. 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 cycler (Applied Biosystem, Foster City, CA, USA) PCR készülékben amplifikálódtak. A kapilláris elektroferézishez 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.

4. EREDMÉNYEK

4.1. Citogenetika és molekuláris citogenetika

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. 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 nők esetében a 195 betegből 15 esetben (7,7%) mutattunk ki citogenetikai eltérést. 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 mutattunk ki.

4.2. Az Y kromoszóma AZF régiójának vizsgálata

A 64 azoospermiás 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 oligozoospermiás 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 normozoospermiás 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.

AZFb+c deléciót és b1/b3 típusú parciális mikrodélációt 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 a 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.

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. A normozoospermias csoport hialuronsav-kötődési képessége szignifikánsan magasabb volt, mint az oligozoospermias, asthenozoospermias és az oligoasthenozoospermias férfiaké ($P < 0,001$).

4.4. A spermiumok kromoszóma aberrációinak meghatározása

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 asthenozoospermias és a normozoospermias

csoportok között. A 17-es kromoszóma diszómia frekvenciája szignifikánsan magasabb volt az oligozoospermiás csoportban, mint a normozoospermiás esetekben ($P=0,0387$).

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, fordított korrelációt a spermium koncentráció és a becsült számbeli kromoszóma aberráció gyakoriság ($r= - 0,668$), valamint a hialuronsav-kötődési képesség és a becsült számbeli kromoszóma aberráció gyakoriság ($r= - 0,682$) között.

4.6. Szegregációs analízis

Egy férfin 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.

A spermium sejtek FISH vizsgálata során a spermatozoák szignálmintázatából következtettünk a sejtek kromoszóma szegregációjának módjára. 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.

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 ($P < 0,0001$). A nemi kromoszómák diszómia frekvenciáját szignifikánsan magasabbnak találtuk a transzlokációt hordozó férfi esetében, mint a normozoospermiás ($P < 0,05$) és az oligozoospermiás egyéneknél ($P = 0,05$). 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).

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.

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. 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.

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. A Klinefelter szindróma 80–90%-át a klasszikus 47,XXY forma, míg a fennmaradó 10–20%-ot

magasabb fokú aneuploidia és mozaicizmus alkotja. 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.

A 47,XXY 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. A kromoszóma-rendellenességek, spontán abortuszok kockázata azonban megnő a 47,XXY 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. Munkánk során az infertilis férfiak között 47,XXY 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. 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. Gyakoribbak a mozaikos esetek, ahol egyes sejtvonalakban elvész az aberráns Y kromoszóma, vagy normál Y kromoszómát tartalmazó sejtekkel együtt jelenik

meg mozaikos formában. 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. Az esetek legnagyobb részének hátterében (80%) az Y kromoszóma SRY génjének autoszómára vagy az X kromoszómára való transzlokációja áll. 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. 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. Az autoszómális transzlokációk gyakoriságát a meddőség miatt vizsgáltak között 5,63%-nek találták a kontroll csoport 1,28%-os gyakoriságához képest. Az oligozoospermiás és azoospermiás férfiak körében magasabbnak bizonyult a Robertson transzlokációt hordozók aránya az átlag populációban észlelttel szemben. 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%). Az autoszóma rendellenességek okozta infertilitás az e kromoszómákon található, a nemi differenciálódásban szerepet játszó gének mutációjával, elvesztésével, vagy egyéb módon történő inaktiválódásával magyarázható. Másrészt a meiózis során a rendellenes homológ kromoszóma párok a crossing over alatt interkromoszómális hatás révén a többi kromoszóma

aneuploidiáját is okozhatják. 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 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. A Robertson transzlokációk közül férfi infertilitás okaként leggyakrabban a 13-as és 14-es kromoszómák közötti Robertson transzlokációt említik. 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. A 9-es kromoszóma centromerikus heterokromatinjának pericentrikus inverziója a kromoszóma polimorfizmusok közé sorolható, azonban felvetődött a férfi fertilitásban játszott szerepe. 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%). Más szerzők a kromoszómák heterokromatinjának inverzióját azoospermiás betegekben gyakrabban mutatták ki, mint az átlag populációban. Az inverzió spermatogenezisre kifejtett hatása a spermiumok morfológiájának, mozgékonyságának és a meiotikus szegregáció módosításának tulajdonítható. Munkánk során férfi infertilitásban két esetben (2/305 férfi) találtunk 9-es kromoszóma pericentrikus inverziót, ami hasonló az átlag populációban talált inverzió előfordulási gyakoriságához (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. 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. 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 Turner-szindrómára jellemző az alacsony testmagasság, a gonád diszgenezis, az elégtelen női nemi hormon produkció miatt az ovárium elégtelenség és az infertilitás. 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 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. 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.

Az autoszómák kiegyensúlyozott reciprok és Robertson transzlokációi női infertilitásban is szerepet játszanak. Az autoszomális transzlokációk gyakoriságát női infertilitásban 0,5% alattinak becsülik. 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 aneuploidióját okozzák. 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.

A kromoszómák inverziójának populációs előfordulási gyakorisága irodalmi adatok szerint 0,8‰, míg a 9-es kromoszóma heterokromatin pericentrikus inverziójáé ennek kétszerese. 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. 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

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 deléciónak előfordulása a többi csoporthoz képest. A b1/b3 parciális deléciót csak egy azoospermiás esetben tudtuk kimutatni. A gr/gr deléción 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 $<1 \times 10^6/\text{ml}$ spermiumkoncentrációjú (súlyos oligozoospermiás) férfiak esetében. Ritkább a mikrodeléció az $1-5 \times 10^6/\text{ml}$ spermiumkoncentrációjú infertilis férfiaknál. 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.

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 oligozoospermiasok között az előfordulási gyakoriság 4% körüli. 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.

AZFc deléció esetén mód van sikeres asszisztált reprodukcióra, de ennek során a genetikai eltérés minden fenotípusos következményével átöröklődik a fiú utódba. Az AZFc deléciós Y kromoszóma a meiosis során elvész, ezért az AZFc deléciót hordozó férfiak hímvarsejtjeinek nagy része nulliszóm a nemi kromoszómára nézve. Az utódban gyakoribb lehet a nemi kromoszómák aneuploidiaja, mozaicizmusa és jelentős a kockázat Turner-szindróma kialakulására. Megfigyeléseink amellet 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. Az Y kromoszóma delécióit 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.

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 megy végbe. A remodeling szükséges ahhoz, hogy megjelenjenek a spermiumsejtek felszínén a zona pellucida kötőhelyek és a hialuronsav receptorok. Az éretlen, citoplazma retenciót mutató spermiumok kreatin kináz (CK) tartalma magas és HspA2 szintje alacsony, ezek a sejtek képtelenek a zona pellucidához való kötődésre. Az érett spermiumok a zona pellucidához hasonlóan a hialuronsavhoz is szelektíven kötődnek. Mesterséges körülmények között a frissen ejakulált és a cryoprezervált érett spermiumok is képesek kötődni a hialuronsavhoz, így elválaszthatók egymástól az érett és éretlen spermiumok.

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.

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. A meddő férfiak többségének csökkent spermiumkoncentrációjú és mozgású ejakulátumában az éretlen spermiumok aránya és a számbeli kromoszóma rendellenességet hordozó spermiumok előfordulási gyakorisága magasabb.

Szoros egyenes összefüggést igazoltak egyes munkacsoportok az éretlen spermiumok aránya és az aneuploid spermiumok gyakorisága és fordított korrelációt a spermiumkoncentráció és a spermiuméretlenség között. 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) diszóma frekvenciájának ismeretében. Munkánk során 45 különböző spermiumparaméterekkel rendelkező férfi spermiumának kromoszóma aberrációi gyakoriságát tanulmányoztuk. A nemi kromoszómák és a 17-es kromoszóma diszóma 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. 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 vetelési arányért jelentős mértékben felelősek az apai részről átvett kromoszóma-rendellenességek.

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. 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%). A triploidia gyakori oka a koraterhességi veszteségeknek, a spontán vetélések 12-13%-ában fordul elő.

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. Csökkent spermiumkoncentrációjú férfiak spermiumaiban gyakoriak az aneuploidiák.

A spermiumok éretlensége és az aneuploidiája közötti kapcsolatot a HspA2 fehérje funkciója kapcsán érthetjük meg. A HspA2 egy chaperon, melynek expressziója két hullámban történik a spermatogenezis és a spermiogenezis során. 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, csökkent expressziója a meiózis hibájához, aneuploidiához, kromoszóma aberrációkhoz vezet. A citoplazma retencióval jellemezhető éretlen spermiumok HspA2 szintje szintén alacsony.

Szignifikáns összefüggést találtak ($r=0,7$) a citoplazma retencióval rendelkező éretlen spermiumok aránya és a spermiumok aneuploidia frekvenciája között, arra utalva, hogy az aneuploidia éretlen és csökkent HspA2 szinttel rendelkező spermium sejtekre jellemző. A zona pellucida kötőhelyek és a spermiumérettség közötti összefüggést is korábban igazolták: csak az érett spermiumok képesek a zona pellucida kötésére. Az érett spermiumok hialuronsav-kötő receptorral 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. Korábban igazolták, hogy a hialuronsav-kötött sejtek kromoszóma aneuploidiáinak gyakorisága alacsony.

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 aneuploidiák, mint a normozoospermiások ivarsejtjeiben. 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.

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.

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. A transzlokáció hordozók jelentős arányban képeznek kiegyensúlyozatlan kromoszóma készletű gamétákat, melyek vetélésekhez, infertilitáshoz vezetnek.

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. A többi szegregációs mód kiegyensúlyozatlan kromoszóma készletet eredményez. Az adjacent szegregációk nullizómiát és diszómiát eredményeznek a spermatozoóban 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).

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. A Robertson-transzlokáció esetén a kiegyensúlyozatlan sejtek aránya csak 2,7-26,5% között

változhat, mivel a meiosis során a trivalens cisz konfigurációja az alternate szegregációnak kedvez, normál és kiegyensúlyozott gamétákat eredményezve.

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 választható 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.

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. A kiegyensúlyozott reciprok transzlokáció hordozók esetében az ICE aneuploid embriót eredményezhet.

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, reprodukzív prognózis megállapítására ad lehetőséget. IVF esetén pre-implantációs genetikai diagnosztika indokolt azoknak a pároknak, akik egyikében kiegyensúlyozott transzlokáció igazolódott.

5.8. Az *FMR1* gén tripletexpánziója korai ovárium elégtelenségben

A korai ovárium elégtelenség (POF) jellemzője a 40 éves kor előtt megjelenő amenorrhoea magas FSH és LH szinttel. Számos gén lehet felelős a POF kialakulásáért, főleg azok amelyek a hipotalamusz-hipofízis-ovárium tengely szabályozásában vesznek részt. Az X kromoszóma hosszúkar (Xq) deléciója vagy transzlokációja összefüggésben van a POF

kialakulásával az ovárium funkcióját befolyásoló gének deléciója illetve funkciókiesése révén. A POF 33%-ban családi halmozódást mutat, a többi eset sporadikus.

A leggyakrabban vizsgált gén POF esetében az Xq27.3 régióba lokalizálódó *FMR1* gén. A tünetek kialakulásáért a gén premutációja felelős: sporadikus esetekben 1,6%, míg familiáris halmozódásnál 16%-ban lehet az *FMR1* gén premutációjára számítani. Más tanulmányok szerint az összesített előfordulási gyakoriság 6%. Az *FMR1* premutációt hordozó nők 15-25%-a korai ovárium elégtelenségben szenved.

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.

6. MEGÁLLAPÍTÁSOK

1. *Férfi infertilitás* hátterében 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.

7. ÖSSZEFOGLALÁS

A fejlett országokban az infertilitás gyakorisága 10-15%-ra tehető, az esetek felének hátterében genetikai eltérés állhat. A genetikai vizsgálat első lépése a hagyományos kromoszóma analízis, melyet a tünetek függvényében célzott molekuláris genetikai vizsgálatok követnek. Laboratóriumunkban 500 infertilis esetben 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 tripletexpanzióját mutattuk ki. Infertilis férfiakban a Klinefelter szindróma (3,3%) és az autoszómákat érintő transzlokációk igazolódtak leggyakrabban az infertilitás hátterében (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 hátterében álló ok, az etiológia tisztázása. Így az asszisztált reprodukció sikeressége csak valószínűsíthető.

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 mikrodélációinak és parciális mikrodélációinak 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



Az értekezés témájában elhangzott előadások

Mokánszki A., Balogh E., Ujfalusi A., Sümegi A., Varga A., Jakab A., Molnár Zs., Sápy T., Oláh É.: A spermium FISH vizsgálat jelentősége infertilitásban. *A Magyar Humánogenetikai Társaság VIII. Kongresszusa*, Debrecen (2010)

Mokánszki A., Molnár Zs., Bazsáné Kassai Zs., Balogh E., Ujfalusi A., Sümegi A., Jakab A., Oláh É.: Heredaganatos férfiak spermaképének, fertilizációs képességének és spermium kromoszóma anomáliáinak változása tumorelles kezelés előtt. *A Magyar Andrológiai Tudományos Társaság IV. Kongresszusa*, Bikal (2010)

Mokánszki A., Balogh E., Ujfalusi A., Sümegi A., Varga A., Jakab A., Molnár Zs., Sápy T., Oláh É.: A spermium FISH vizsgálat jelentősége infertilitásban. *A MTA Debreceni Akadémiai Bizottság, „Ritka genetikai betegségek korszerű diagnosztikája” tudományos ülése*, Debrecen (2011)

Mokánszki A., Sümegi A., Sápy T., Tóthné Varga E., Bodnár B., Varga A., Oláh É.: Az Y kromoszóma részleges mikrodelécióinak vizsgálata férfi meddségben. *A Magyar Andrológiai Tudományos Társaság V. Kongresszusa*, Hévíz (2011)

Mokánszki A.: Az infertilitás genetikai kivizsgálása. *A MTA, „A humán reprodukció kihívásai a XXI. század elején” tudományos ülése*, Budapest (2011)

Mokánszki A., Ujfalusi A., Balogh E., Sápy T., Jakab A., Varga A., Oláh É.: Genetikai vizsgálatok női és férfi infertilitásban. *A Magyar Humánogenetikai Társaság IX. Kongresszusa*, Szeged (2012)

Mokánszki A., Ujfalusi A., Balogh E., Molnár Zs., Bazsáné Kassai Zs., Sápy T., Jakab A., Varga A., Oláh É.: Genetikai vizsgálatok férfi infertilitásban. *A Magyar Andrológiai Tudományos Társaság VI. Kongresszusa*, Eger (2012)

További előadások

Mokánszki A., Körhegyi I., Szabó N., Bereg E., Gyurgyinka G., Balogh E., Bessenyei B., Sümegi A., Sztriha L., Oláh É.: Genetikai vizsgálatok neuronális migrációs zavarokban. *A Magyar Humánogenetikai Társaság VIII. Kongresszusa*, Debrecen (2010)

Mokánszki A., Körhegyi I., Szabó N., Bereg E., Gyurgyinka G., Balogh E., Bessenyei B., Sümegi A., Sztriha L., Oláh É.: Genetikai vizsgálatok neuronális migrációs zavarokban. *A MTA Debreceni Akadémiai Bizottság, „Ritka genetikai betegségek korszerű diagnosztikája” tudományos ülése*, Debrecen (2011)

Mokánszki A., Körhegyi I., Szabó N., Bereg E., Gyurgyinka G., Balogh E., Bessenyei B., Sümegi A., Sztriha L., Oláh É.: Genetikai vizsgálatok neuronális migrációs zavarokban. *A Magyar Gyermekorvosok Társaságának 2011. évi Nagygyűlése*, Pécs (2011)