

Egyetemi doktori (Ph. D.) értekezés tézisei

**SPERMIMUM SZELEKCIÓ HUMÁN ASSZISZTÁLT REPRODUKCIÓHOZ –
KÜLÖNBÖZŐ SPERMIMUM ELŐKÉSZÍTÉSI ELJÁRÁSOK HATÁSÁNAK
VIZSGÁLATA A SZÁMBELI KROMOSZÓMA RENDELLENESÉGGEL ÉS
ÉRETLENSÉGGEL SÚJTOTT IVARSEJTEK GYAKORISÁGÁNAK
ALAKULÁSÁRA**

Sperm selection for human assisted reproduction - examination of the safety of different sperm preparation methods in eliminating spermatozoa with numerical chromosome abnormalities and cellular immaturity

DR. JAKAB ATTILA

DEBRECENI EGYETEM

ORVOS- ÉS EGÉSZSÉGTUDOMÁNYI CENTRUM

ÁLTALÁNOS ORVOSTUDOMÁNYI KAR

SZÜLÉSZETI ÉS NŐGYÓGYÁSZATI KLINIKA

Témavezető: Prof. Dr. Borsos Antal egyetemi tanár

Debrecen, 2003.

Bevezetés

A modern asszisztált reprodukciós eljárások, különösen az intracitoplazmatikus spermium injektálás (ICSI) bevezetésével hatásos kezelés vált lehetővé a súlyos infertilitásban szenvedő férfiak számára is. Az ICSI-t széles körben és növekvő mértékben sikerrel használják az asszisztált reprodukciós beavatkozások során, azonban a közelmúltban napvilágot látott kutatások a citogenetikus eltérések utódokba való átvitelének emelkedett kockázatáról számoltak be. Ezek az adatok az ICSI során megkerült élettani spermium szelekció klinikai jelentőségére és veszélyeire hívják fel a figyelmet. A természetes kiválasztódás elmaradásának veszélyéhez társul még további kockázatemelő tényezőként, hogy a meddő férfiak, az ICSI donorok spermájában a számbeli kromoszóma anomáliát (aneuploidiát és poliploidiát) hordozó spermiumok előfordulási gyakorisága emelkedett. ICSI során sikeres lehet a megtermékenyítés éretlen spermiummal is, melyek között emelkedett arányban található aneuploid ivarsejtek.

A fluoreszcens in situ hibridizációs (FISH) eljárás bevezetésével vált lehetővé a számbeli kromoszóma eltérések vizsgálata nagyszámú spermiumon, amely lehetővé teszi az eltérések előfordulási gyakoriságának pontos meghatározását az egyes mintákban. Bár számos tanulmány foglalkozott a spermium számbeli kromoszóma eltéréseinek és a férfi meddőségnek a kapcsolatával, az intenzív kutatás ellenére mindeddig nem került sor a számbeli kromoszóma anomália és a spermium morfológiája, motilitása, valamint a fertilizációs képessége közötti kapcsolat pontos tisztázására.

Tekintettel a genetikai eltérések utódba való átvitelének fokozott kockázatára és az emelkedő számú asszisztált reprodukciós beavatkozásra, természetes és sürgető az igény a kromoszóma anomáliát hordozó ivarsejteknek a fertilizációt megelőző eliminálására. Napjainkig kevés adat látott napvilágot az asszisztált reprodukciós laboratóriumokban jelenleg alkalmazott spermium előkészítési eljárások (az éretlen spermiumok eltérő fajsúlyán alapuló *grádiens centrifugálás*

és a motilis ivarsejtek dúsítását célzó *swim-up módszer*) ilyen irányú hatékonyságát illetően.

A citoplazma retenciával jellemezhető éretlen spermiumok aránya és a kromoszóma aneuploidiák előfordulási gyakorisága között szoros összefüggés van, amely arra utal, hogy az aneuploidia elsősorban éretlen spermiumban fordul elő. Az érett spermium szelektíven kötődik a zona pellucidához, de ICSI során az éretlen sejttel is lehetséges a fertilizáció. Az ICSI jelenlegi gyakorlata még nem nevezhető ideális megoldásnak, mivel az embriológus által, a motilitást és a morfológiát szem előtt tartva szubjektív módon kiválasztott spermium genetikai rendellenességet hordozhat. A genetikai tartalom és a morfológia közötti kapcsolat kiemelten fontos az ICSI gyakorlatának szempontjából, de az irodalmi adatok e vonatkozásban sem adnak egyértelmű útbaigazítást.

A spermiogenezis utolsó lépéseinek egyikeként, a citoplazma kilökődésével párhuzamosan a sejthártya szintén átalakuláson megy át (remodeling), amelynek eredményeképpen zona pellucida kötőhelyek és hialuronsav receptorok egyaránt megjelennek. Éppen úgy, mint a zona pellucidához, a hialuronsavval kezelt felszínhez is kizárólag az érett spermiumok képesek kötődni. A hialuronsav kötődés egy új szelekciós lehetőséget kínál az éretlen spermiumok eliminálásához.

Célkitűzések

A spermium genetikai károsodásainak ICSI során az utódba való átvitelének fokozott kockázatára és a jelenleg alkalmazott spermium szelekciós eljárások hatékonyságára vonatkozó tudományos információ elégtelenségére alapozva, a értekezésemet megalapozó kutatómunkánk fő kérdései a következők voltak:

1. Milyen a számbeli kromoszóma anomáliák előfordulási gyakorisága az ICSI beavatkozások donorait reprezentáló alacsony spermium

- koncentrációjú férfiak körében és tükrözi-e a hagyományos WHO kategóriák szerint megállapított spermogram a minta számbeli kromoszóma anomáliáinak gyakoriságát? [A *Populációs Tanulmány: Az aneuploid/diploid spermiumok előfordulási gyakoriságának meghatározása alacsony spermium koncentrációjú infertilis férfiakban, valamint azoknak a hagyományos WHO spermogram kategóriákhoz való viszonyának vizsgálata.*]
2. Lehetséges-e az aneuploid/diploid spermiumok eliminálása a jelenlegi gyakorlatban alkalmazott spermium előkészítési eljárásokkal? [A *Grádiens Centrifugációs Tanulmány és a Swim-Up Tanulmány: A hagyományos spermium előkészítési eljárások hatékonyságának vizsgálata és összehasonlítása az aneuploid/diploid spermiumok, valamint az éretlen spermiumok eliminálását illetően.*]
 3. Lehetséges-e aneuploidiától/diploidiától mentes spermium kiválasztása vizuális módszerrel? [A *Morfológiai Tanulmány: A spermium morfológia és a számbeli kromoszóma anomáliák összefüggésének vizsgálata azonos spermiumon FISH és objektív, computerizált morfometria segítségével.*]
 4. Lehetséges-e aneuploidiától/diploidiától mentes spermium kiválasztása hialuronsav-kötődésen alapuló módszerrel? [A *Hialuronsav-kötődés Tanulmány: A hialuronsav-kötődésen alapuló spermium szelekció hatékonyságának vizsgálata a kromoszóma rendellenességet alacsony gyakorisággal hordozó érett spermiumok szelekcióját illetően.*]

Anyag és Módszerek

A vizsgálatokra a Debreceni Egyetem Szülészeti és Nőgyógyászati Klinikája és a Yale Egyetem (New Haven, Connecticut, USA) Szülészeti és Nőgyógyászati Intézetének kollaborációjának keretében került sor. A tanulmányok 44 beteg vizsgálatát ölelték fel, akik sperma analízisre jelentkeztek a Yale Egyetem

Reproduktív Endokrinológiai Részlegének Spermium Fiziológiai és IVF Laboratóriumaiban. A spermium koncentráció és motilitás meghatározása Makler kamrában történt, computer vezérelt sperma analízissel. Tíz-tíz mérsékelt oligospermiás betegnél a sperma vizsgálatát követően grádiens centrifugálás és swim-up módszerrel nyert frakciók FISH és kreatin-kináz immuncitokémiai vizsgálatára került sor. Tizenkét oligospermiás betegnél hialuronsav-kötődéssel végzett szelekció előtt és után végeztük a vizsgálatokat. További tizenkét normospermiás IFV donor esetén grádiens preparáláson átesett mintákat vizsgáltunk, hialuronsav-kötődéssel végzett szelekció előtt és után. A swim-up és hialuronsavas kísérletekhez kötődő spermium előkészítés, a FISH laboratóriumi munkák, a sejtelezés, adatgyűjtés és a tanulmányok adatfeldolgozása a tézisek szerzőjének önálló munkái (34 beteg 68 mintája, 88 FISH analízis).

Grádiens centrifugálásos előkészítés során az érett spermiumban gazdag frakció előállítására érdekében, a sperma egy részét 2 ml 80%-os egyfázisú Percoll grádiensen keresztül centrifugáltuk 500 g-vel 20 percig szobahőmérsékleten, majd a felülúszót eltávolítva az üledéket humán tubafolyadékban (HTF) oldottuk.

Swim-up előkészítés során a spermát HTF-ben hígítva egy lapos aljú csőben centrifugáltuk 400 g-vel 10 percig, amelyet ezután 30 percig inkubáltunk 36°C-on. Az inkubáció alatt a motilis spermiumok a felülúszóba migráltak, míg a mozdulatlan spermiumok és egyéb partikulák a cső alján maradtak. Az inkubáció után a motilis spermiumokban gazdag 0,5 ml felülúszót óvatosan eltávolítottuk.

A hialuronsav-kötődéses szelekciós kísérletekhez bakteriális eredetű hialuronsavat használtunk, amely Petri csésze alapjára került felvitelre 100-300 µm szolid pontok formájában, közelükbe helyeztük az HTF-ben oldott spermiumokat. Az érett spermiumok a hialuronsav pontok közelébe kerülve ahhoz tartósan kötődnek. 15 perces inkubáció után a kötődött spermiumokat ICSI mikropipettával egyenként eltávolítottuk és mikroszkóp tárgylemezre helyeztük.

A kiindulási és a szelekciós eljárások után nyert frakciókból keneteket készítve végeztük a FISH és kreatinkináz(CK)-immuncitokémiai vizsgálatokat.

Az éretlen spermiumokra jellemző citoplazma retenció kimutatásához a keneteket poliklonális anti-CK-B antiszérummal, majd biotinilált második antitesttel kezeltük. A citoplazmát, amelyre a magas CK tartalom jellemző, ABC (avidin-biotin complex) eljárással tettük láthatóvá. A spermiumok értékelésénél *érett* (citoplazma retenció nélküli) és *éretlen* (CK immunofestéssel kimutatott citoplazma retenciával jellemzett) sejteket különböztettünk meg.

A FISH eljárás előtt a spermium kondenzált állapotban lévő kromatin állományát a DNS szonda számára hozzáférhetővé kell tenni, ezért a keneteket először ditiotreitollal (DTT, dekondezáció), majd litium sóval (LIS, duzzasztás) kezeltük. A FISH vizsgálatokhoz 5-féle kromoszóma szondát használtunk (10, 11, 17, X és Y), melyeket indirekt módon jelöltünk zöld és piros fluorokrómokkal (biotin-avidin FITC és digoxigenin-antidigoxigenin rodamin). Bicolor és multicolor FISH-t egyaránt alkalmaztunk. Az autoszómális diszómia és a diploidia kimutatásához a 10-es és a 11-es szondát használtuk (bicolor FISH). Mivel legalább három szonda szükséges a nemi kromoszóma diszómia kimutatásához, ehhez multicolor FISH-t készítettünk X, Y és 17-es szonda szimultán hibridizálásával, ahol a 17-es kromoszómát biotinnal és digoxigeninnel egyaránt jelölt szondával detektáltuk, így annak a fluoreszcens profilja a két alkalmazott fluorokróm kombinációja lett (narancssárga). Grádiens centrifugálás esetén multicolor, swim-up eljárás esetén bicolor és multicolor, hialuronsav kötődés esetén multicolor FISH-t készítettünk mind a kiindulási, mind a szelekciós eljárással nyert spermium populációkon (44 beteg, 108 FISH analízis). A FISH mintákon a sejtek értékelését az elfogadott szigorú kritériumok alapján végeztük. A diszómia és diploidia gyakoriság pontos megállapításához mintánként ~4-10000 spermiumot értékeltünk (összesen 472345 sejt a 44 beteg 88 mintájában), kivéve a hialuronsavval szelektált spermium populációkat, ahol a módszer természetéből adódóan az értékelhető ivarsejtek száma változó és limitált volt. Az értékelt keneteken a hibridizációs hatékonyság 98% feletti volt.

A morfológiai tanulmány és az objektív computerizált morfometriai vizsgálat két részből állt. (A) A első kísérletsorozatban vizsgáltuk, hogy a spermiumok megtartják-e alaki tulajdonságaikat a FISH vizsgálatához elengedhetetlen dekonzenzációs és denaturációs lépések során. (B) A továbbiakban az aneuploidia/diploidia és az alaki tulajdonságok kapcsolatát vizsgáltuk. FISH-el detektált aneuploid és diploid sejtek objektív morfometriai elemzését végeztük erre a célra kifejlesztett software segítségével (Metamorph).

A különböző WHO kritériumok szerint megállapított spermatogram csoportokban előforduló aneuploidia/diploidia gyakoriságok közötti különbségeket az OR értékek és a 95% CI megadásával jellemeztük. A kiindulási és a szelektált sejtpopulációk diszómia és diploidia gyakoriságai, valamint az éretlen sejtek arányai közötti különbségeket a kontingencia táblázatok χ^2 próba elemzésével végeztük. Mann-Whitney Rank Sum Tesztet alkalmaztunk a frakciók közötti motilitásbeli különbségek elemzésére. A motilitás, az éretlen sejtek aránya és az aneuploidia gyakoriság közötti összefüggéseket Pearson korrelációs teszttel vizsgáltuk. A morfometriai analízis során párosított t-tesztet és ANOVA tesztet alkalmaztunk a különböző csoportok mutatóinak összehasonlítására, dekonzenzáció előtt és után. A szignifikancia szint $p < 0.05$ volt.

Eredmények és Megbeszélés

1. A Populációs Tanulmány: Az aneuploid/diploid spermiumok előfordulási gyakoriságának meghatározása alacsony spermium koncentrációjú infertilis férfiakban, valamint azoknak a hagyományos WHO spermogram kategóriákhoz való viszonyának vizsgálata.

A tanulmányokba bevont betegek közül 32 esetben került sor a kezeletlen sperma FISH vizsgálatára. Az átlagos spermium koncentráció $18,2 \pm 1,5 \times 10^6$

spermium/ml (átlag \pm SEM, tartomány 8,0-45,5), az átlagos motilitás 49,4 \pm 1,65% (30,0-69,2). Összesen 200696 spermium értékelését végeztük a 32 beteg ejakulátumában (átlag 6272, tartomány 5030-7340) a 17-es, X és Y kromoszómákra. A mintákat a WHO definíciók szerinti csoportokba soroltuk. Az átlagos nemi kromoszóma diszómia gyakoriság 0,16% volt, a 17-es 0,36%. A detektált diszómia és diploidia gyakoriságokat alapul véve a számbeli kromoszóma anomáliák kumulatív gyakorisága a vizsgált, mérsékelt oligospermias anyagon 8,3%-ra tehető, amely reprezentálja egy aneuploid/diploid spermium kiválasztásának kockázatát előszelekción át nem esett, csökkent spermium koncentrációjú minta esetén. Adataink az aneuploidia gyakoriság enyhe emelkedését támasztják alá csökkent spermium koncentráció (<50x10⁶ spermium/ml) esetén. Ugyanakkor a WHO kritériumok szerinti csoportosítás, mint pl. az oligospermia 20x10⁶ spermium/ml alatt, nem jellemzi az aneuploidia gyakoriság növekedésének kockázatát. Bár a nemi kromoszóma diszómia gyakorisága valóban emelkedett volt oligospermia esetén, korrelációt nem mutattunk ki a spermium koncentráció és egyetlen vizsgált kromoszóma aneuploidia esetén sem. A leggyakoribb diszómia féleség az XY diszómia volt, melynek több mint kétszeres emelkedését találtuk oligospermia esetén (0,17% vs. 0,08%). Ez a megállapítás összhangban van azzal a megfigyeléssel, miszerint a ICSI utódok között leginkább a nemi kromoszóma triszómiák szaporodása, mindenekelőtt Klinefelter szindróma (47, XXY) gyakoriságának 3-4-szeres emelkedése figyelhető meg.

Poliploidiak vonatkozásában, a diploid spermium gyakoriság jelentős emelkedését dokumentáltuk csökkent motilitású mintákban (asthenozoospermia), különösen ha mindez csökkent spermiumszámmal társult, vagyis oligoasthenozoospermia esetén (0,96%). Ez a megfigyelés alátámasztja a diploidia keletkezése és a meiózis hibái közötti feltételezett összefüggéseket, másrészt a számfeletti kromoszómasorozattal bíró spermiumok csökkent motilitására is utal.

A diploidiák eredetének vonatkozásában néhány további eredeti megfigyelést is tettünk. A hibás kromoszóma szeparáció akár a meiózis I. (M1), akár a meiózis II. (M2) esetén felelős lehet a diploid spermatozoon keletkezéséért. Olyan spermában, ahol a diploidia gyakoriság emelkedése dokumentálható, vagy az M1 eredetű (XY), vagy az M2 eredetű (XX vagy YY) diploid ivarsejtek dominanciája mindig megfigyelhető. Ez arra utal, hogy emelkedett diploidia gyakoriság eseteiben vagy az M1 során bekövetkező kromoszómális non-diszjunkció, vagy az M2 során elmaradt sejtmag hasadás jelentkezik a diploid ivarsejtek megszorodásának okaként. Mivel leggyakrabban az M2 eredetű XX és YY diploidok megszorodása figyelhető meg oligospermia eseteiben, legtöbbször a második meiotikus oszlás során bekövetkező hiba felelős a számfelletti kromoszóma sorozat keletkezéséért. Következésképpen a II. meiotikus sejtmag oszlás során fellépő hiba nemcsak emelkedett számú diploid spermiumok képződéséhez vezet, hanem a csökkent spermium számért is felelős lehet.

2. A Grádiens Centrifugációs Tanulmány és a Swim-Up Tanulmány: A hagyományos spermium előkészítési eljárások hatékonyságának vizsgálata és összehasonlítása az aneuploid/diploid spermiumok, valamint az éretlen spermiumok eliminálását illetően.

A kumulatív adatokat értékelve a grádiens centrifugálás és a swim-up módszer egyaránt szignifikáns ($P < 0.001$) módon csökkenti az aneuploid, diploid és éretlen spermiumok gyakoriságát. Az eredmények azonban különbözőek az alkalmazott módszertől függően. A Grádiens Centrifugációs Tanulmányban, a szelektációs eljárás után mind a 10 beteg mintájában csökkent a diszómia gyakoriság és az éretlen sejtek aránya, de csak kettőnél a diploidia frekvencia. A Swim-up Tanulmány 10 betegéből 7 esetben csökkent az éretlen sejtek aránya és csak egy esetben csökkent szignifikáns módon a diszómia, azonban 8 mintánál a

módszer hatékonyan csökkentette a diploidia előfordulásának gyakoriságát. A különbség a két módszer között szintén egyértelmű, ha a tisztítási hatékonyságot elemezzük: diszómia esetén a grádiens módszerrel 3,2-szeres tisztítást (clearance rate), a swim-up módszerrel csak 1,4-1,5-szörös (bicolor és multicolor FISH-el detektálva) tisztítást értünk el. A diploidia esetén azonban a tisztítás jóval hatékonyabb swim-up módszerrel (2,7-szeres), mint a grádiens centrifugálással (1,4-szeres). Adataink meggyőző bizonyítékkal szolgálnak arra, hogy a grádiens centrifugálás hatékonyan eliminálja az éretlen és aneuploid spermiumokat, míg a swim-up a diploid ivarsejtek esetében képes ugyanerre azok csökkent motilitásánál fogva. Míg szoros korreláció mutatkozik az éretlen sejtek aránya és az aneuploid sejtek gyakorisága között, nem mutatható ki szoros kapcsolat az aneuploidia frekvencia és a motilitás között.

A grádiens centrifugálás hatékonysága az aneuploidiák eliminálását illetően annak a ténynek tulajdonítható, hogy az éretlen sejtek citoplazma retenciójuk miatt kisebb fajsúlyúak és nem kerülnek az üledékbe. A swim-up módszer esetén az éretlen és érett sejtek eltérő motilitása hat szelekciós tényezőként, amely azonban jóval kevésbé diszkriminatív az aneuploidiák vonatkozásában. A négyszerest is meghaladó redukció a diploidok vonatkozásában ugyanakkor a kétfarkú diploid sejtek nagymértékben csökkent előrehaladásával magyarázható, vagyis a swim-up módszer elsősorban a kétfarkú diploid spermiumokat képes eliminálni.

3. A Morfológiai Tanulmány: A spermium morfológia és a számbeli kromoszóma anomáliák összefüggésének vizsgálata azonos spermiumon FISH és objektív, computerizált morfometria segítségével.

Azonos spermiumokon végzett objektív morfometriai és FISH vizsgálataink azt célozták megválaszolni, hogy vajon lehetséges-e egy spermium genetikai számbeli kromoszóma anomáliájára következtetni az alaki jellemzőiből kiindulva,

amely lehetővé tenné az ICSI embriológusának a biztonságos választást. Bár számos közlemény felvetette már az abnormális morfológia és az emelkedett aneuploidia/diploidia gyakoriság kapcsolatát egy-egy mintán belül, a két faktor együttes vizsgálatára azonos spermiumon mindeddig nem került sor. A spermium morfológia és diszómia/diploidia közötti kapcsolat direkt vizsgálatához először igazolni kellett, hogy a spermium fő alaki jellemzőit nem befolyásolják a hatásos FISH készítéséhez szükséges dekonzenzációs és denaturációs lépések. Szabályos, intermedier, abnormális és amorf spermium kategóriák vizsgálata, amelyek általában az éretlenség súlyosbodó fokozatait jellemzik, növekedő mértékű aneuploidia gyakoriságra utalt. Mivel igazoltuk, hogy a dekonzenzáció/denaturáció a sejt méretének növekedésén kívül az alaki sajátosságokat egyebekben nem befolyásolja, direkt módon vizsgálhattuk az alaki összefüggéseket FISH-el igazolt aneuploidia/diploidia esetén. A vizsgálat második fázisának adatai szerint még az alakilag legszabályosabb spermium populáció – melyet mind vizuális módszerrel, mind computerizált objektív morfometriával állapítottunk meg – esetén is mintegy 7%-os aneuploidia és diploidia gyakoriság fordul elő. Mind a diszómia, mind a diploidia emelkedő gyakorisággal fordul elő az egyre súlyosabb morfológiai eltérések esetén és leggyakoribb a legéretlenebb amorf sejtek között. Mégis igazolt tény, hogy kromoszóma anomália még a legegészségesebb morfológiájú spermiumban is komoly eséllyel előfordulhat, ezért az alaki jellemzők alapján történő válogatás ICSI előtt nem zárja ki a genetikai rendellenesség, főleg az aneuploidiák átörökítését.

4. A Hialuronsav-kötődés Tanulmány: A hialuronsav-kötődésen alapuló spermium szelekció hatékonyságának vizsgálata a kromoszóma rendellenességet alacsony gyakorisággal hordozó érett spermiumok szelekcióját illetően.

Tekintet nélkül arra, hogy a hialuronsavhoz kötődött spermiumokat oligospermiás vagy grádiens centrifugálással előkezelt normospermiás mintából válogattuk, azok igen alacsony (< 0.10%) aneuploidia gyakoriságot mutattak. A hialuronsav szelekció hatékonyan csökkentette a diszómia gyakoriságot egy olyan alacsony szintre, amely alacsonyabb az egészséges férfiakra jellemzőnél. A diploidia gyakoriság szintén mindkét csoportban sokszorososan csökkent, az oligospermiás minták esetén 0,81%-ról 0,13%-ra, a normospermiás csoportban 0,58%-ról 0,10%-ra, vagyis a redukció konzekvensen 6,1-szeres volt tekintet nélkül a kiindulási gyakoriságra.

A spermium éretlensége és az aneuploidia közötti kapcsolatért egy kísérő fehérje (chaperone protein, HspA2) kettős szerepe tehető felelőssé; egyrészt támogatja a meiózist mint a szinaptonémális komplex összetevője, másrészt szerepet játszik a spermiogenezis utolsó lépéseinél. A HspA2 szintézis második hullámával és a citoplazma kilökődésével párhuzamosan egy érettséggel összefüggő plazmamembrán átrendeződés (remodeling) megy végbe, amely szükséges a zona pellucida kötőhelyek és a hialuronsav receptorok megjelenéséhez a spermium felszínén. Az éretlen, citoplazma retenciót mutató spermiumok kreatin kináz (CK) tartalma magas és HspA2 szintje alacsony, ezek a sejtek képtelenek a zonához való kötődésre. A zonához hasonlóan az érett sejtek a hialuronsavhoz is szelektíven kötődnek. Jelen tanulmány adatai meggyőzően bizonyítják, hogy a hialuronsav kötődés révén szelektált érett spermiumok számbeli kromoszóma anomália gyakorisága alacsony, hasonlóan a zona pellucida által szelektált spermium populációhoz. A hialuronsav a női genitális traktusban élettani körülmények között is jelen van, pl. a cervicalis

nyákban vagy a cumulus oophorusban. Ezekkel a spermium mindig érintkezik, vagyis a hialuronsav laboratóriumi használata spermiumszelekciós célokra etikailag elfogadható.

A nemi kromoszóma diszómia négyes csökkenése a hialuronsavhoz kötődött spermium populációban egyezést mutat a kromoszóma anomáliák szaporodásának mértékével ICSI utódok között. A diszómia és diploidia gyakoriságára kifejtett egyaránt hatékony redukció, amely az érett spermium sejtmembránjának hialuronsav receptorán alapszik, ígéretes lehetőséget kínál az ICSI céljára történő spermiumszelekcióra.

Megállapítások

1. Alacsony spermium koncentrációjú férfiaknál, akik potenciális ICSI donorok, emelkedett a nemi kromoszóma aneuploidiát hordozó spermiumok gyakorisága, különös tekintettel az XY diszómia. A diploidia gyakoriság jelentős emelkedésével elsősorban oligoasthenozoospermia esetén kell számolni. A hibás kromoszóma szeparáció (non-diszjunkció) akár a meiózis I., akár a meiózis II. során diploid spermiumok képződéséhez vezethet, de alacsony spermium koncentrációhoz társuló emelkedett diploidia gyakoriság esetén általában a meiózis II. során fellépő sejtmag hasadási zavar okolható. A hagyományos WHO kritériumok szerinti sperma analízis (spermium koncentráció, motilitás és morfológia) nem alkalmas a minta számbeli kromoszóma anomália gyakoriságának hozzávetőleges megítélésére. A kockázat nagyszámú dekondezált spermiumon végzett FISH vizsgálattal mutatható ki.
2. ICSI során, tekintettel a genetikai eltéréseknek utódba való átvitelének fokozott kockázatára, természetes a törekvés a kromoszóma anomáliát hordozó ivarsejteknek a fertilizációt megelőző eliminálására. A jelenleg alkalmazott spermium szelekciós eljárások (a gradiens centrifugálás és a

- swim-up módszer) nem mutatnak egyaránt kielégítő hatékonyságot az aneuploid és a diploid ivarsejtek eliminálásában. A grádiens centrifugálás hatékonyan csökkenti az éretlen és az aneuploid spermiumok gyakoriságát, a swim-up módszer viszont megfelelően képes redukálni a diploid spermiumok előfordulását azok csökkent motilitásánál fogva. Míg szoros korreláció mutatkozik az éretlen sejtek aránya és az aneuploid sejtek gyakorisága között, nem mutatható ki szoros kapcsolat az aneuploidia frekvencia és a motilitás között. Nagy anyagon nyert meggyőző adataink alapján javasoljuk, hogy (1) alacsony spermium koncentráció és megtartott motilitás esetén a grádiens centrifugálás a megfelelő választás az aneuploid spermiumok eliminálására, ha azonban (2) oligoasthenozoospermia, különösen oligoasthenoteratozoospermia mutatható ki, a swim-up módszer a hatékonyabb a feltehetően emelkedett diploidia frekvencia redukálására.
3. Azonos spermiumokon végzett citogenetikai és morfológiai vizsgálatról korábban még nem számoltak be, e tekintetben munkánk úttörő. Igazoltuk, hogy tekintet nélkül a spermium eredeti alaki tulajdonságaira, a FISH készítéshez szükséges dekonzenzáció/denaturáció során a spermium megtartja alaki jellemzőit. Komputerezált objektív morfometriai mérésekkel bizonyítottuk, hogy a számbeli kromoszóma eltérés előfordulása alakilag egészséges spermiumban nem elhanyagolható. Az alaki jellemzők alapján történő spermium választás ICSI céljára nem küszöböli ki számbeli a kromoszóma eltérések átvitelének emelkedett kockázatát.
 4. Laboratóriumi körülmények között kifejlesztettünk és sikerrel alkalmaztunk egy spermium szelekciós eljárást, amely az érett spermium membrántulajdonságain és hialuronsav kötő kapacitásán alapszik. Csak az érett, igen alacsony diszómia/diploidia gyakorisággal jellemezhető spermiumpopuláció képes a hialuronsavhoz való kötődésre. A hialuronsav szelekció révén elimináltuk a diszómiát/diploidit hordozó spermiumokat, tekintet nélkül a kiindulási gyakoriságra. A hialuronsav kötődéssel végzett

spermium szelekció ígéretes és biztonságos módszer az ICSI-hez felhasznált spermiumok kiválasztásához, valamint a számbeli kromoszóma eltérések utódokba való átviteli kockázatának hatékony csökkentésére.

Az értekezés alapjául szolgáló közlemények

In-extenso peer review közlemények

Jakab A, Kovacs T, Celik C, Huszar G. The origin of spermatozoa with extra chromosome set. Hum Reprod 2003; 18: 459-459. IF: 2.99

Jakab A, Kovacs T, Kovanci E, Vigue L, Borsos A, Ward DC, Huszar G. Számbeli kromoszóma eltérések humán spermiumban alacsony spermium-koncentráció esetén (Numerical chromosome aberrations in human sperm at low semen concentration). Orv Hetil 2003 (in press)

Jakab A, Kovacs T, Borsos A, Huszar G. Számbeli kromoszóma eltérések gyakorisága humán spermiumban és asszisztált reprodukciós vonatkozások (Numerical chromosome aberrations in sperm and their significance in assisted reproduction). Magyar Andrologia 2003; 8: 13-19.

Jakab A, Kovacs T, Zavaczki Z, Borsos A, Bray-Ward P, Ward D, Huszar G. Efficacy of the swim-up method in eliminating spermatozoa with diminished maturity and aneuploidy. Hum Reprod 2003; 18 (in press) IF: 2.99

Celik-Ozenci C, Catalanotti J, **Jakab A**, Aksu C, Demir R, Huszar G. Human sperm maintain their shape following decondensation and denaturation for FISH: shape analysis and objective morphometry. Biology of Reproduction 2003 (in press) IF: 3.51

Könyvfejezetek

Huszar G, **Jakab A**, Celik-Ozenci C, Sakkas D, Kovacs T, Vigue L. Sperm testing by hyaluronic acid binding: andrologic laboratory assessment and sperm selection for ICSI. In: Biotechnology of Human Reproduction. Revelli A, Tur-Kaspa I and Massabrio M eds. Parthenon Publishing, New York, 2003; 149-157.

Kovács T, **Jakab A**, Kovanci E, Závaczki Z, Sakkas D, Huszar G. Preparation of sperm fractions and individual sperm with low levels of chromosomal aneuploidies for assisted reproduction. In: Essential IVF Volume 1. Van Blerkom J and Gregory L eds. Kluwer Academic Publishers, Norwell, MA, USA, in press.

Peer review absztraktok

Celik-Ozenci C, **Jakab A**, Vigue L, Demir R, Huszar G,. Mature and fertile sperm selectively bind to hyaluronic acid: cytoplasmic content, HspA2 levels, chromatin maturity, shape and ICSI sperm selection. J Soc Gynecol Investig Suppl. 2002; 9: Jan/Febr: p340A. Abstract No. 849. (SGI 49th Meeting, March 20-23, 2002, Los Angeles, CA) IF: 2.83

Huszar G, Celik-Ozenci C, **Jakab A**, Vigue L. A double chamber device for advanced sperm testing: semen analysis and an assay for sperm maturity by hyaluronic acid (HA) binding. J Andrology Suppl. 2002: March/April: p55., Abstract No: 119. (27th Annual Meeting of the American Society of Andrology, April 24-27, 2002, Seattle, WA) IF: 2.13

Jakab A, Sakkas D, Celik-Ozenci C, Vigue L, Ward D, Bray-Ward P, Huszar G. Selection of sperm with low aneuploidy frequency for ICSI. (a munkát az ESHRE Established Scientist Prize-ra jelölték) Hum Reprod 2002; 17(Abstract Book 1): p35-36. (ESHRE 18th Meeting, July 1-3, 2002, Wien, Austria) IF: 2.99

Kovacs T, **Jakab A**, Borsos A, Vigue L, Huszar G. Association of diploidy and double tails in human sperm. Hum Reprod 2002; 17(Abstract Book 1): 104. (ESHRE 18th Meeting, July 1-3, 2002, Wien, Austria) IF: 2.99

Celik-Ozenci C, Catalanotti J, **Jakab A**, Kovacs T, Demir R, Huszar G. Can one visually select aneuploidy free sperm: a study of morphometry and fluorescence in-situ hybridization. (a munkát az ESHRE Young Investigator Prize-ra jelölték)

Hum Reprod 2002; 17(Abstract Book 1): 41. (ESHRE 18th Meeting, July 1-3, 2002, Wien, Austria) IF: 2.99

Jakab A, Kovacs T, Borsos A, Ward DC, Bray-Ward P, Huszar G. Association between diploidy and double heads in spermatozoa arising from meiosis I. and meiosis II. Hum Reprod 2003; 18: (abstract, in press) (ESHRE 19th Meeting, July 29-June 2, 2003, Madrid, Spain) IF: 2.99

Egyéb közlemények

In extenso

Jakab A. Management of the menopause and HRT by ultrasound. Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol, 1997;71:55-162. IF: 0.88

Jakab A, Balogh A, Tóth Z. Vaginosonography in the Menopause. In: Gautam Allahbadia ed. Endosonography in Obstetrics and Gynecology. Bombay: Rotunda Medical Technologies Pvt. Ltd. 1997: 557-577.

Jakab A, Óvári L, Balogh Á, Tóth Z. Vaginosonography and Hormone Replacement Therapy in the Menopause. In: Gautam Allahbadia ed. Endosonography in Obstetrics and Gynecology. Bombay: Rotunda Medical Technologies Pvt. Ltd. 1997: 578-588.

Major T, Bacskó G, Fülöp B, Juhász B, **Jakab A.** Az endometrium ellenőrzése tamoxifen kezelés alatt [Assesment of endometrium during tamoxifen treatment]. Orv Hetil 1998;139(3):121-124.

Tóth Z, Óvári L, **Jakab A,** Juhász B, Mező T, Csapó B, Török O. Ultrasound guided punctures. In: Gautam Allahbadia ed. Transvaginal Sonography in Infertility. Bombay: Rotunda Medical Technologies Pvt. Ltd. 1998(volume 1): 203-210.

Jakab A, Török O, Tóth Z. Vaginosonography and subchorionic hematomas. In: Gautam Allahbadia ed. Transvaginal Sonography in Infertility. Bombay: Rotunda Medical Technologies Pvt. Ltd. 1998(volume 2): 347-353.

Jakab A, Kovács T, Csécsei K, Juhász B, Török O, Tóth Z. Gestational Trophoblastic Tumors and Vaginosonography. In: Gautam Allahbadia ed. Transvaginal Sonography in Infertility. Bombay: Rotunda Medical Technologies Pvt. Ltd. 1998(volume 2): 555-565.

Jakab A. A Debreceni Orvostudományi Egyetem Szülészeti és Nőgyógyászati Klinikájáról dióhéjban [Brief Report on the Department of Obstetrics and Gynecology, University Medical School of Debrecen]. Új Bába Kalauz. 1998;II. évf. 2. szám: 6-7.

Petrusné KE, **Jakab A.** Menopausa ellátás a gyakorlatban [Menopause Care in Practice]. Új Bába Kalauz. 1998;II.évf. 3. szám: 43-45.

Tóth Z. Török O, Bolodár A, Juhász B, Szabó M, Veress L, Ditrói P, Aranyosi J, **Jakab A**, Óvári L. Az embrió és a magzat fejlődési és kromoszóma rendellenességeinek ultrahang- és biokémiai kutatása. In: A Népjóléti Minisztérium 1994-1996. évi tárcaszintű kutatási témáinak beszámolója, 1-2 kötet. Szerk.: Népjóléti Minisztérium ETT Titkársága Kutatásszervezési Osztálya, Budapest, 1998; pp. 619-620.

Tóth Z. Török O, Bolodár A, Juhász B, Szabó M, Veress L, Ditrói P, Aranyosi J, **Jakab A**, Óvári L. Ultrasound and biochemical study of embryonic and fetal malformations and chromosomal aberrations. In: Topic Reports of Ministry Level Research of Ministry of Welfare 1994-1996. Volume 1-2. Ed: Research Department of the Medical Research Council, Budapest, 1998; pp. 611-612.

Jakab A. Nőgyógyászati megbetegedések időskorban [Gynecologic Disorders in Ageing Women]. In: Síró Béla - Bódor Csilla eds.: Gyakorlati geriátria [Geriatry in Practice]. Budapest: Springer Orvosi Kiadó 1999: 207-212.

Szeverényi P, Kovácsné TZ, **Jakab A**, Bacskó G, Birinyi L, Czifra I, Balogh A. Depression among menopausal patients. In: F Facchinetti, P Nijs, D Richter eds.: European Psychosomatic Obstetrics and Gynaecology. Editeam S.A.S. Gruppo Editoreale 1999: 45-48.

Jakab A. Az endometrium functionalis ultrahangképe tamoxifenkezelés alatt. Ca és csont. 1999;2(Suppl.1):16-19.

Jakab A. Menopausa [Menopause]. In: Dr. Lővegy András ed.: A klinikai endokrinológia és anyagcsere-betegségek kézikönyve [Textbook of Clinical Endocrinology and Metabolism]. Budapest: Medicina Kiadó, 2001:511-522.

Borsos A, **Jakab A.** eds. A női gonádműködés endokrin zavarai [Disorders of Gynecologic Endocrin System] . In: Dr. Lővegy András ed.: A klinikai endokrinológia és anyagcsere-betegségek kézikönyve [Textbook of Clinical Endocrinology and Metabolism]. Budapest: Medicina Kiadó, 2001:480-535.

Jakab A. Koraterhességi pathológiás állapotok [Pathologic Early Pregnancy]. In: Papp Z. és Tóth Z. eds. Szülészeti-nőgyógyászati ultrahang diagnosztika [Ultrasound Diagnosis in Obstetrics and Gynecology]. Budapest: Golden Book Kiadó, 2001: 97-108

Jakab A. Ultrahangvizsgálatok menopausában [Ultrasound Examinations in the Menopause]. In: Papp Z, Tóth Z eds. Szülészeti-nőgyógyászati ultrahang diagnosztika [Ultrasound Diagnosis in Obstetrics and Gynecology]. Budapest: Golden Book Kiadó, 2001: 407-421

Jakab A, Óvári L, Juhász B, Birinyi L, Bacskó G, Tóth Z. Méhen belüli elváltozások ultrahang-diagnosztikája [Ultrasound diagnosis of focal intrauterine lesions]. Orv Hetil 2002; 143. 1739-1743.

Aranyosi J, Zatik J, **Jakab A,** Kovács T, Csapó B, Juhász B. A Doppler-ultrahang szülészeti alkalmazásának gyakorlati szempontjai. Orv Hetil (accepted for publication)

Absztraktok

Jakab A, Ovári L, Ditrói P, Juhász B, Tóth Z. How does the first trimester ultrasound influence the incidence of molar pregnancies? Ultrasound Obstet Gynecol 1994;4:Suppl.1. p.60.

Jakab A, Ovári L, Ditrói P, Juhász B, Török O, Tóth Z. Do the first-trimester subchorionic hematomas affect the ongoing pregnancy? *Ultrasound Obstet Gynecol* 1994;4:Suppl.1. p.113.

Ovári L, **Jakab A**, Ditrói P, Juhász B, Török O, Tóth Z. First-trimester screening for fetal malformations by ultrasound. *Ultrasound Obstet Gynecol* 1994;4:Suppl.1. p.113.

Ditrói P, Kóródi I, Tóth Z, Juhász B, Ovári L, **Jakab A**. Changes in the diagnosis and treatment of ectopic pregnancy at the Department of Obstetrics and Gynecology of Debrecen. *Ultrasound Obstet Gynecol* 1994;4:Suppl.1. p.72.

Juhász B, Bacskó G, **Jakab A**, Ditrói P, Ovári L, Tóth Z. Transvaginal sonography or hysteroscopy in the diagnosis of different uterine disorders? *Ultrasound Obstet Gynecol* 1994;4:Suppl.1. p.78.

Tóth Z, **Jakab A Jr**, Óvári L, Juhász B, Ditrói P, Mező T, Kovács T, Török O. Prognostic value of reduced first trimester ultrasound parameters. *Ultrasound Obstet Gynecol* 1995;6:Suppl.2. p.115.

Balogh A, Bacskó G, **Jakab A Jr**, Margitai B, Czifra I. Uterine bleeding during hormone replacement therapy (HRT) for postmenopausal osteoporosis. *Asia-Oceania J Obstet Gynecol*, 1995;21:Suppl.1.p.46.

Jakab A, Óvári L, Juhász B, Balogh A, Tóth Z. The influence of age and hormone replacement on uterine perfusion detected by transvaginal colour Doppler. *Eur J Ultrasound* 1996;4:Suppl.1.p.77.

Juhász B, **Jakab A**, Óvári L, Tóth Z. Cycle monitoring by combination of power Doppler Imaging (PDI) with endocrine studies. *Eur J Ultrasound* 1996;4:Suppl.1.p.77.

Óvári L, Major T, **Jakab A**, Juhász B, Tóth Z. How could help the ultrasonography in the management of pelvic ultrasound cystic masses in the adolescent age. Eur J Ultrasound 1996;4:Suppl.1.p.73.

Jakab A, Óvári L, Juhász B, Tóth Z. The influence of age and hormone replacement therapy on endometrial thickness and subendometrial vascularisation in the menopause detected by transvaginal power Doppler. Ultrasound Obstet Gynecol 1996;8:Suppl.1.p.198.

Zatik J, **Jakab A**, Óvári L, Juhász B, Tóth Z. The effect of estrogen-gestogen replacement in the menopause detected by transvaginal colour Doppler. Ultrasound Obstet Gynecol 1996;8:Suppl.1.p.169.

Ditrói P, Kóródi I, Juhász B, **Jakab A**, Óvári L, Tóth Z. Differential diagnostic problems of ectopic pregnancy. Ultrasound Obstet Gynecol 1996;8:Suppl.1.p.147.

Óvári L, Major T, **Jakab A**, Juhász B, Tóth Z. The role of ultrasonography in the management of pelvic cystic masses in the adolescent age. Ultrasound Obstet Gynecol 1996;8:Suppl.1.p.148.

Tóth Z, Juhász B, Óvári L, **Jakab A**, Ditrói P, Török O, Zatik J. the significance of transvaginal ultrasound and ultrasound guided transvaginal aspiration in the diagnosis and treatment of tubo-ovarian abscesses. Ultrasound Obstet Gynecol 1996;8:Suppl.1.p.169.

Juhász B, **Jakab A**, Óvári L, Tóth Z. Has transvaginal colour Doppler (TVCD) changed routine gynaecological practice. Ultrasound Obstet Gynecol 1996;8:Suppl.1.p.198.

Mező T, **Jakab A**, Óvári L, Juhász B, Tóth Z. First trimester transvaginal ultrasound decreases the incidence of molar pregnancies. Česko-Slovenska Pediatrie. 1997;7:478

Óvári L, **Jakab A**, Ditrói P, Juhász B, Tóth Z. Do the first trimester subchorionic hematomas affect the ongoing pregnancy? Česko-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. Česko-Slovenska Pediatrie. 1997;7:481.

Balogh A, Bettembuk P, Bacskó G, **Jakab A**. Integrated management of postmenopausal osteoporosis in a regional centre in Hungary. Maturitas 1997;27:S210.

Jakab A, Óvári L, Tóth Z, Balogh A. Uterine notching reflects the arterial status and the arterial effect of HRT. Maturitas 1997;27:S164.

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

Balogh A, Bettembuk P, **Jakab A**, Bacskó G. Hormone replacement therapy (HRT) for postmenopausal osteoporosis. Acta Obstet Gynecol Scand. 1997;76:P63.32.

Jakab A, Óvári L, Bodnár B, Borsos A, Tóth Z. Uterine perfusion during GnRH agonist treatment for endometriosis. Gynecol Endocrinol 1998; 12 (Suppl. 2): FC153.

Jakab A. Management of the menopause and HRT by ultrasound. Menopause Digest 1998; 2: 25-27.

Török O, Kovács T, **Jakab A**, Tóth Z. Can fetal pulse oxymetry replace fetal blood sampling during labour? Fetal Diagn Ther 1998;13(suppl 1):121.

Török O, Kovács T, **Jakab A**, Tóth Z. The need for fetal scalp blood sampling in cases monitored by fetal pulse oxymeter. *Prenatal and Neonatal Medicine* 1998;3(suppl 1):49.

Jakab A, Juhász B, Óvári L, Major T, Birinyi L, Bacskó G, Tóth Z. Power Doppler imaging in the diagnosis of endometrial polyps - the feeding vessels. *Ultrasound Obstet Gynecol* 1998;12(suppl 1):14.

Óvári L, **Jakab A**, Zatik J, Juhász B, Tóth Z. Ultrasound guided aspiration of tuboovarian abscesses. *Ultrasound Obstet Gynecol* 1998;12(suppl 1):78.

Tóth Z, Óvári L, **Jakab A**, Török O. Hysterocontrastsonography (HyCoSy) by power Doppler imaging. *Ultrasound Obstet Gynecol* 1998;12(suppl 1):192.

Jakab A, Csordás T, Óvári L, Török O, Tóth Z. The disappearing mole: the preventive role of first trimester ultrasound. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol*, 1999; 86(Suppl.): S97.

Jakab A, Birinyi L, Juhász B, Major T, Bacskó G, Tóth Z. Endometrial polyps in the menopause. *Maturitas* 2000; 35(Suppl.1.): S84.

Jakab A, Juhász B, Bacskó G, Major T, Tóth Z. Ultrasound diagnosis of endometrial polyps. *Int J Obstet Gynecol*. 2000;70(suppl.1): 1.37.

Zatik J, Major T, **Jakab A**, Tóth Z, Fülesdi B. The effect of hyperventilation on maternal cerebral blood flow velocity in preeclamptic and normal pregnancies: is there evidence for an altered cerebral vasoreactivity. *Int J Obstet Gynecol*. 2000;70(suppl.1):3.97.

Szeverenyi P, Kovacs-Torok Z, **Jakab A**, Birinyi L, Balogh A. Depression among women visiting a menopausal outpatient clinic. *Maturitas* 2002; 5 (Suppl. 1.): 104.

Jakab A Jr. Klinikai tapasztalatok a Yadine tablettával [Clinical experience with the Yasmin pill] Nőgyógyászati és Szülészeti Továbbképző Szemle [Contemporary OB/GYN Hungarian Edition] 2002; 4(Suppl.1): 88-90.

Jakab A, Juhasz B, Bacsko G, Toth Z. Diagnosis of intrauterine polyps and myomas with grey-scale, power Doppler ultrasound and hysteroscopy: comparison of detection rates. Ultrasound Obstet Gynecol 2002; 20(Suppl 1.): 55.

Kovacs T, Aranyosi J, **Jakab A,** Major T, Zatik J, Toth Z. Value of cerebroplacental and aortocerebral Doppler ratios in twin pregnancies with growth discordance. Ultrasound Obstet Gynecol 2002; 20(Suppl 1.): 58.

Toth Z, Torok O, **Jakab A,** Kovacs T. Ultrasound monitoring of prostaglandin-induced cervical ripening. Ultrasound Obstet Gynecol 2002; 20(Suppl 1.): 89.