

EGYETEMI DOKTORI (PhD) ÉRTEKEZÉS

Heredaganatos betegek fertilitása: genetikai, epigenetikai és funkcionális spermium vizsgálatok

Dr. Molnár Zsuzsanna

Témavezető: Dr. Jakab Attila



DEBRECENI EGYETEM

KLINIKAI ORVOSTUDOMÁNYOK DOKTORI ISKOLA

Debrecen, 2014

Tartalomjegyzék

RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE.....	4
BEVEZETÉS.....	5
IRODALMI ÁTTEKINTÉS.....	7
Heretumor.....	7
Epidemiológia.....	7
Etiológia	8
Csoportosítás	11
Kezelés.....	13
Prognózis	14
Tumorelles kezelés hatása a fertilitásra	15
Krioprezerváció	16
Spermatogenezis és spermium biomarkerek	17
Célkitűzések	23
BETEGEK ÉS MÓDSZEREK.....	25
Spermiogram eltérések elemzése heretumoros betegeknél	25
Heretumoros betegek fertilitásának utánkövetése	25
Spermium funkcionális, genetikai és epigenetikai vizsgálata heretumor esetén.....	26
EREDMÉNYEK.....	33
Spermiogram eltérések elemzése heretumoros betegeknél – eredmények.....	33
Heretumoros betegek fertilitásának utánkövetése – eredmények.....	37

Spermium funkcionális, genetikai és epigenetikai vizsgálata heretumor esetén – eredmények.....	38
Spermiogram elemzésének eredményei	38
Számbeli kromoszóma rendellenességek vizsgálata FISH módszerrel	39
Anilin kék festés eredményei	41
Spermium hialuronsav kötődési vizsgálat eredményei	42
Szövettan alapján történő csoportosítás eredményei	43
Korrelációs analízis eredményei.....	44
MEGBESZÉLÉS	48
Új megállapítások	56
ÖSSZEFOGLALÁS	59
SUMMARY	60
IRODALOMJEGYZÉK	61
A disszertációban felhasznált irodalom jegyzéke.....	61
Dr. Molnár Zsuzsanna publikációinak jegyzéke	69
Dr. Molnár Zsuzsanna a disszertáció témájához kapcsolódó előadásainak listája.....	72
TÁRGYSZAVAK	75
KEYWORDS	75
KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS.....	76
FÜGGELÉK	77

RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE

AB – anilin kék festés (aniline blue)

AFP - alfa fetoprotein

ART - asszisztált reprodukciós technika

BEP - bleomycin, etoposid, cisplatin kombináció

CK - kreatin kináz

FISH – fluorescens in situ hibridizáció

HBA – hialuronsav kötődési vizsgálat (Hyaluronian Binding Assay)

hCG - humán korionális gonadotropin

HD – Non-Hodgkin-kór

HS – hialuronsav

IO – infertilis, oligozoospermiás betegek

ITGCN - intratubularis csírasejtes neoplázia (intratubular germ cell neoplasia)

IVF - in vitro fertilizáció

IVF-ET – in vitro fertilizáció és embrió transzfer

NHD – Hodgkin kór

NZ – normozoospermiás férfiak

PVB - cisplatin, vinblastin, bleomycin kombináció

RLA - retroperiotneális lymphadenectomia

TC - testicularis carcinoma

TCN – testicularis carcinoma normozoospermiával

TCO – testicularis carcinoma oligozoospermiával

VIP - etoposid, ifosfamid, cisplatin kombináció

WHO - World Health Organisation

BEVEZETÉS

A diagnosztika, a kemoterápia és irradiációs kezelések területén végbement fejlődésnek köszönhetően, a reprodukív életkorban jelentkező tumorok túlélése napjainkra jelentősen javult. Emiatt egyre nagyobb figyelem fordul a tumorelles kezelés késői szövődményéből, az esetleges gondataoxicitából eredő infertilitásra.

A fiatal, daganatos betegek családtervezése sokszor el sem kezdődött, vagy ha igen, akkor sem lezárt. A fejlett országokban tapasztaltaknak megfelelően sajnos hazánkban is egyre későbbi életkorra tolódik a gyermekvállalás, ugyanakkor jól ismert, hogy az életkor előrehaladtával a fertilitás csökken. Magyarországon 2011-ben a nők átlagosan 29,4 évesen szűlték az első gyermeküket. A férfiak életkoráról ilyen adat nincs. A 2008-ben apává vált férfiak átlagéletkora 32,8 év volt. Jól tükrözik ezek az adatok a fertilitás megőrzésnek fontosságát, valamint a fertilitásra vonatkozó klinikai markerek iránt növekvő igényt, különös tekintettel az eleve csökkent fertilitással járó állapotok esetén.

A malignus betegség önmagában is hatással lehet a nemi működésre, a spermatogenezisre hormonális és metabolikus hatásain keresztül. A reprodukív rendszer hormonjainak szintje csökkenhet tumoros betegekben, ami lehet a szervezetet ért stressz következménye vagy a tumorszövet által szekretált anyag hatása. Ismert, sokak által leír megfigyelés, hogy a heretumoros betegek 10-15%-a a daganat diagnosztizálásakor azoospermiás, jelentős részük pedig oligozoospermiás. Ezeket az eredményeket a betegség kezelésére alkalmazott kemoterápiás gyógyszerek illetve a sugárkezelés tovább ronthatja. Eredményezhet átmeneti romlást a spermaképben, de permanens azoospermia is előfordul. A fertilitás megőrzésére ezen betegcsoportban a napi gyakorlat szintjén felmerül az igény. A kezelés előtti spermium fagyasztás lehetőséget ad a későbbi gyermekvállalásra, akkor is ha a kezelés, mely a túlélést, gyógyulást jelenti, infertilitást okoz.

A fagyasztva tárolt minták minőségi jellemzőiről kevés adat áll rendelkezésre, mivel eddig csak kis esetszámú vizsgálatok történtek. Nagyobb tanulmányok a kemoterápia hatását vizsgálják. Bár a napi rutin diagnosztikában alkalmazott WHO V. szerinti ejakulátum elemzés a nemzőképesség megítélésére még napjainkban is gold standardként számontartott módszer, nagyon fontos ebben a speciális betegcsoportban nem csak a kvantitatív, hanem a kvalitatív elemzések elvégzése is. Ismert, hogy a spermioqram elemei (koncentráció, motilitás, morfológia) nincsenek szoros összefüggésben az adott minta genetikai és funkcionális jellemzőivel, a fertilizációs képességgel. A tumoros folyamat, illetve az általa triggerelt faktorok spermatogenezisre kifejtett közvetlen hatása sem teljes mértékben tisztázott még.

Jelen disszertáció áttekinti a heretumor klinikai jelentőségét, etiológiáját, csoportosítását, kezelési lehetőségeit és a prognózist. Kiemelten foglalkozik a heredaganat és az infertilitás kapcsolatával, amely háttérében állhat egyrészt a közös etiológia, másrészt a daganatos betegség direkt hatásából és a tumorelles kezelés gonadotoxikus szövődményéből tevődik össze.

A dolgozatban leírt vizsgálatok a fertilitás megőrzésének lehetőségét, ennek gyakorlati vonatkozásait célozzák heretumoros és infertilis betegekben. Leíró és experimentális módszerekkel vizsgáljuk a heretumoros betegek spermatogenezisét és fertilitási prognózisát. Összehasonlítás történik a normál, és infertilis esetben talált eredményekkel, mely elemzés betekintést ad a heretumor spermatogenezisre kifejtett hatására.

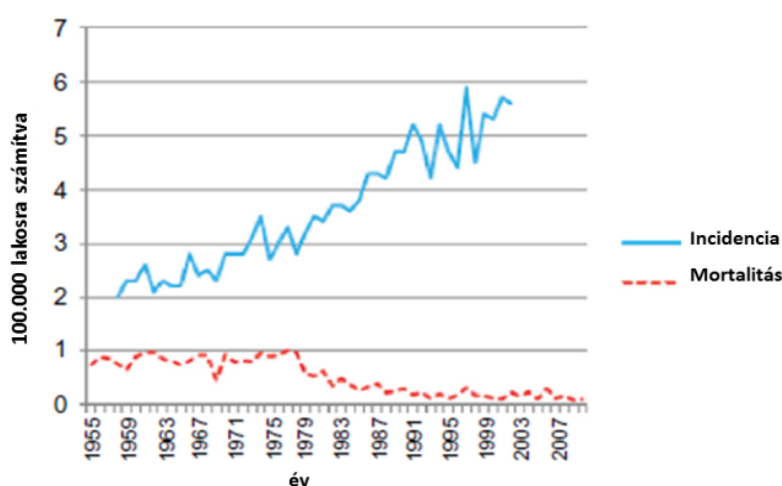
IRODALMI ÁTTEKINTÉS

Heretumor

Epidemiológia

A here csírasejt eredetű tumora az összes malignus megbetegedés közel 1%-át, az összes urológiai daganat 5%-át teszi ki {1}. Ugyanakkor a 15 és 40 év közötti férfiak leggyakoribb rosszindulatú solid daganata. Előfordulási gyakorisága az utóbbi 40 évben világszerte több mint kétszeresére nőtt (1. ábra). A női gonád, az ovárium malignus tumorát ezzel szembe helyezve azt látjuk, hogy a gyakorisága kis csökkenést mutatott, nem látunk ehhez hasonló intenzív emelkedést {2}.

A nyugat-európai országokban a heretumor előfordulása 6-8/100 000 fő. Epidemiológiai tanulmányok igazolják, hogy a hererák incidenciája nagymértékben függ a földrajzi elhelyezkedéstől és etnikai hovatartozástól. Az észak-európai országokban figyelték meg a legnagyobb (1. ábra), Ázsiában és Afrikában pedig a legalacsonyabb előfordulási gyakoriságot. Amerikában a fehérbőrű lakosságnak ötször nagyobb kockázata van hererák kialakulására, mint az afroamerikaiaknak {3}.



1. ábra Svédországban a heretumoros esetek 100.000 főre számított incidenciájának és a mortalitásnak a változása 1955-től {3}

A Nemzeti Rákregiszter adatai szerint Magyarországon 2012-ben 645 új heretumoros megbetegedés fordult elő {4}. A bejelentett esetek életkori megoszlására jellemző, hogy az életkori csúcs 30 és 40 év között van, a betegek 59%-a (378/645) pedig 40 évesnél fiatalabb.

Etiológia

A heredaganat kialakulásának pontos oka nem ismert. A betegek száma elsősorban az iparilag fejlett országokban emelkedik, ami környezeti tényezők szerepére utal.

Az ismert veleszületett hajlamosító tényezők közül a here leszállási zavara, a rejtettheréjűség a legelfogadottabb, kockázati valószínűsége 8-10-szeres {5,6}. A daganat serdülés után jelentkezik. Abdominális elhelyezkedés esetén 6-szor gyakoribb a malignus elfajulás esélye, mint egyéb helyzetű, le nem szállt herében. Az esetek 25%-ban a scrotalis herében jelentkezik daganat, feltételezhetően testicularis dysgenesis miatt. A jelentősen emelkedett kockázatot a 6 éves kor előtt végzett orchidopexia eddigi adatok alapján csökkenti {5}.

Az anamnézisben szereplő heretumor a legerősebb rizikófaktora a heretumornak. A heretumoros betegek 1-2%-nál az ellenoldali herében is kialakul a betegség. Ez az átlagpopulációhoz képest 12,4-szeres kockázatot jelent {7}. A heretumoros betegek 5%-nál mutatható ki az ellenoldali herében intratubularis csírasejtes neoplázia (intratubular germ cell neoplasia, ITGCN, ami a hererák prekursorának tekinthető {8,9}.

Pozitív családi anamnézis esetén az elsőfokú rokonoknál a hererák előfordulási gyakorisága magasabb. A heretumoros betegek 2%-nál pozitív a családi anamnézis. Heretumoros férfi fiútestvérének 8-10 szeres, fiúgyermekének 2-6 szoros a rizikója {10}. A heredaganat családi halmozódása miatt a genetikai háttér oki szerepe is felvetődött. Az X kromoszóma q27 régiójának érintettségét mutatták ki családi halmozódás és kétoldali heretumor esetén {11 }.

Gonád dysgenesis esetén a heretumor kialakulása ismertén nagyon magas (10-50%). Klinefelter-syndroma, androgen insensitivitas syndroma és a Down kór is fokozott rizikót jelent. A genitáliák fejlődési rendellenessége, egyéb kórállapotai (ingunalis sérv, hydrocele, hereatrophia) és a heretumor között csak gyenge kapcsolatot mutattak ki {12}. Az infertilitás és hererák kapcsolatát napjainkban is intenzíven vizsgálják. Több tanulmány leírta, hogy a hererákos betegek kemo-, illetve sugárkezelés előtti spermium koncentrációja csökkent {13, 14, 15, 16 }.

A meddőség a párok 15%-át érinti, ebből 50%-ban férfi eredetű ok áll a háttérben {1}. Miközben a férfi eredetű infertilitás incidenciája nő, az idiopathiás esetek arány is egyre nagyobb. Epidemiológiai kutatások azt találták, hogy azoknak a férfiaknak, akiknél életük során hererák alakul ki kevesebb a gyermekük, mint a hozzájuk életkorban illesztett férfiaké {17}.

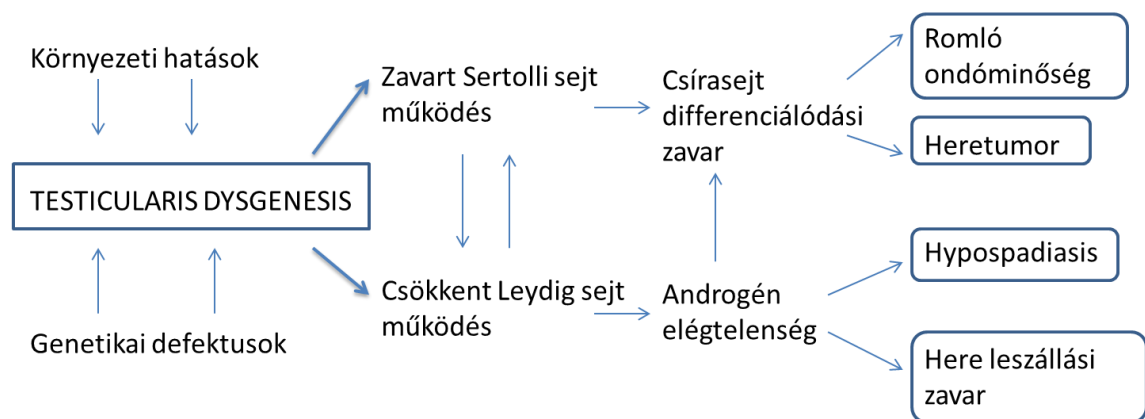
Ismert az is, hogy az infertilitás miatt végzett herebiopszia kapcsán ITGCN gyakrabban látható. Az ITGCN gyakoriságát több tanulmány vizsgálta az elmúlt években, ezek 0–3,5% közötti eredményekről számolnak be, az átlagos előfordulás 0,74% {18}.

Jacobsen és munkacsoportja tanulmányukban megállapítja, hogy infertilis betegek hererák kockázata 1,6-szeres a normál spermium paraméterekkel rendelkezőkhöz képest {19}. Raman ezzel szemben hererák kialakulására 20 x nagyobb rizikót detektál infertilis férfiak esetén, mint bizonyítottan fertilis egyéneknél {20}.

Epidemiológiai tanulmányok elemzése, valamint annak megfigyelése, hogy a heretumor, infertilitás, hereleszállási zavar, hypospadiasis gyakorisága az elmúlt évtizedekben nőtt, együttesen alapozta meg a testicularis dysgenesis syndroma (TDS) létezését. Feltételezhető ezen betegségek háttérében álló közös etiológia. A különböző kórképek különböző és eltérő időben manifesztálódó tünetei ugyanannak a betegségnek {21,22}.

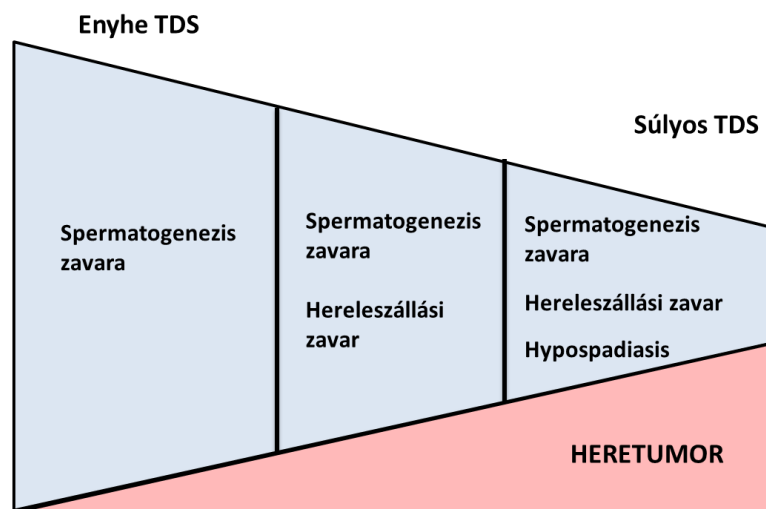
Experimentális és epidemiológiai kutatások eredményei arra mutatnak, hogy a fűmagzatot embrionális fejlődése során érő noxa okoz a here szomatikus és germinális sejtjeiben is változást, mely a testicularis dysgenesis syndrome kialakulásához vezet. Genetikai tényezők és környezeti faktorok együtt alakítják ki a tesztikuláris diszgenezist. Az Leydig sejtek funkciózavarára androgén elégtelenséghez, ezen keresztül pedig hereleszállási zavarhoz, hypospadiasis kialakulásához vezet. A Sertoli sejtek funkciózavarára rendellenes csírasejt differenciációt eredményez, mely megnyilvánulásai a mikrolithiás, heretumor és infertilitás (csökkent ondó minőség) (2. ábra).

A here microlithiasis felhívja a figyelmet az esetlegesen meglévő fokozott heretumor-rizikóra és a csökkent nemzőképesség előfordulására. Az érvényben lévő európai irányelv ezen betegek esetén fokozott uro-onkológiai kivizsgálást, további heretumor-rizikófaktor megléte esetén herebiopszia végzését javasolja {1}.



2. ábra. A testicularis dysgenesis syndrome kialakulásának, patomechanizmusának illetve ezekből következő tünetei {21}

A testicularis dysgenesis syndrome tünetei időben nem egyszerre jelentkeznek. Sorrendiség nem meghatározható. A TDS-nek különböző súlyossági fokú formái vannak, és nem minden tünet jelentkezik minden betegnél. Minél súlyosabb azonban a TDS, annál nagyobb a valószínűsége annak, hogy heretumor alakul ki (3. ábra).



3. ábra. A testicularis dysgenesis syndroma különböző súlyossági fokai {21}

Csoportosítás

A rosszindulatú heredaganat több mint 93%-a csírasejt eredetű tumor (1. táblázat). Az anaplasztikus alfa-fötóprotein (AFP) és/vagy humán chorionális gonadotropin (hCG) szint emelkedéssel járó daganatok valószínűleg csírasejt eredetűek, a kemoterápiás kezelésre jól reagálnak.

A heredaganat lokális terjedésekor a here strukturális szöveteit involválja (rete testis, tunica albuginea, here tokja, mellékhere, funiculus spermaticus, környező nyirok- és vérerek, vénák), regionális terjedése révén limfogén áttét keletkezik. Hematogén áttét a tüdőben, májban és agyban a leggyakoribb, de előfordulhat bőrben (choriocarcinoma), csontban (seminoma), lépben is.

Klinikai szempontból célszerű a csírasejt típusú heredaganatokat két nagy szövettani csoportra, seminoma és non-seminoma típusú daganatokra osztani, mivel ez a kezelést és a prognózist egyaránt meghatározza. Mindkét csoport közel felét teszi ki a heredaganatoknak.

A seminoma leginkább 35-50 éves kor között jelentkezik és nem társul tumormarker (AFP) emelkedéssel. Időnként trofoblasztos, óriás sejteket tartalmaz, melyek hCG-t termelhetnek,

így a hCG emelkedés nem zárja ki a diagnózist. Ritkább variáns a spermatocytas seminoma, mely főleg 45 évesnél idősebb férfiaknál jelentkezik és ritkán ad áttétet. A seminoma mind sugár- mind kemoterápiára jól reagál.

A non-seminoma – embrionális carcinoma, choriocarcinoma, Yolk sac tumor, teratoma és kevert csírasejt tumor – az élet harmadik évtizedében a leggyakoribb. Gyakran társul tumormarker emelkedéssel (AFP, hCG). Az esetek 62%-a kevert csírasejtes daganat.

GERMINÁLIS (csírasejt eredetű) DAGANATOK	
Rákmegelőző elváltozás:	Intratubularis csírasejt daganat (ITGCN)
Germinalis daganatok:	
Egykomponensű (tiszt):	
	• Seminoma
	Seminoma syncytiotrophoblast komponenssel
	Spermatocytás seminoma
	Spermatocytás seminoma sarcomatosus komponenssel
	• Embryonalis carcinoma
	• Yolk sac tumor (endodermalis sinus tumor)
	• Trophoblast tumor
	Choriocarcinoma
	Nem choriocarcinomás trophoblast tumor
	Placentáris eredetű trophoblast tumor
	Monofázisos choriocarcinoma
	• Teratoma
	Dermoid cysta
	Monodermal teratoma
	Teratoma másodlagos malignus komponensekkel
Több komponensű csírasejt daganat (kevert)	
	Embrionális carcinoma + teratoma
	Teratoma+seminoma
	Choriocarcinoma+teratoma/embryonalis carcinoma
	Egyéb

1. táblázat. A heredaganatok szövettani beosztása a WHO ajánlása szerint történik (2004) {23}.

Seminoma és non-seminoma együttes előfordulása esetén a daganatot non-seminoma csoportba soroljuk.

Az intratubularis csírasejtes neoplaziáról (vagy carcinoma in situ) általánosan elfogadott, hogy a felnőttekben az invazív heredaganat prekursora mind seminomák, mind a non-seminomák esetén (kivéve spermatocytas seminoma, Yolk salk tumor, teratoma). Jelenlétekor a heredaganat kialakulásának kumulatív valószínűsége 5 év alatt 50%, 7 év alatt 70% {8,9}. Az ITGCN előfordulása magasabb (2-5%) a cryptorchid herében, a korábban heredaganatos betegek ellenoldali heréjében, míg a csökkent fertilitású férfiak heréjében az előfordulás 0-3,5%, hazai adatok szerint 2,2% {25}.

Kezelés

A heredaganat megalapozott gyanúja esetén az első választandó kezelés (kevés kivételtől eltekintve) a primer tumor eltávolítása, melyre alkalmazott eljárása a radikális inguinalis *semicastratio*. A műtétet minél hamarabb ell kell végezni, mivel a csírasejtes daganatok gyorsan növekednek, duplikációs idejük 4-6 hét is lehet {1,25}.

A heretumor kezelése a semicastratiót követő szövettani vizsgálat, a stádiumbesorolás és a szérum tumormarker vizsgálatok eredményének függvényében az alábbiak lehetnek.

A *surveillance* során kezelés nem történik, szoros kontroll mellett elfogadott kezelési típus. Választható, amennyiben a primer tumor nagysága nem haladja meg non-seminomáknál a 2 cm-et, seminomák esetén a 3 cm-et, a daganatban nem látható ér- és nyirokér-invázió, a tumor nem érinti a here körüli szöveteket, nincs metasztázis és a szérum tumormarkerek referencia tartományban vannak.

Nyirokcsomó áttét megléte esetén *retroperitoneális lymphadecetomia* (RLA) végzendő. A műtét során az aorta és a vena cava közti nyirokcsomók radikális eltávolítása történik. A mindkét oldalra kiterjesztett műtét gyakori velejárója a retrográd ejaculatio és az erectilis dysfunctio, a fertilitásvesztés, amely ennél a korosztálynál jelentős problémát jelent.

A seminomák sugárérzékenyek, így kezelésükre *irradiációs* kezelést alkalmaznak. A retroperitonealis régióra leadott sugárdózis, amely az inguinalis terület kiegészítő „boost”

besugárzásával, alkalmanként kemoterápia vagy salvage RLA végzésével egészülhet ki. A sugárkezelés eredményei hasonlóan jók, mint a non-seminomák kemoterápiás kezelésével elérték {1}.

Prognózis

Kemoterápiás kezelést alkalmaznak azokban az esetekben, mikor a primer tumor állományában ér- vagy nyirokér-invázió van jelen, bizonyos szövettani típusok (pl. choriocarcinoma) esetén, RLA után, ha a preparátum daganatszövetet tartalmazott, megelőző kezelések relapszusa esetén, inoperábilis esetek (bulky disease) induktív kezeléseként, seminomák kezeléseként, nyirok- vagy érbetöréskor illetve alkalmazhatják még a sugárkezelés alternatívájaként.

A kemoterápiás kombinációk platina alapú kezelések. A PVB (cisplatin, vinblastin, bleomycin) sémát kisebb tömegű tumorok, a BEP (bleomycin, etoposid, cisplatin) kezelést nagyobb tumortömeg esetén, a VIP (etoposid, ifosfamid, cisplatin) kezelést másod- vagy harmadvonalbeli kezelésként alkalmazzák.

A heretumor jól kezelhető betegség. A radio-, és kemoterápiában végbement fejlődésnek és a diagnosztikai lehetőségek bővülésének köszönhetően a tumoros betegek túlélési ideje jelentősen javult {1}.

Jó prognózisú beteg esetén a gyógyulás 90-95%-os. A prognózis függ a heretumor szövettani képétől (seminoma vagy non-seminoma), a stádiumtól, és olyan tényezőktől, mint a tumormarker szintje és a távoli metasztázis elhelyezkedése.

Jó prognózisú seminoma esetén (esetek 90%-a) az 5 éves túlélés 86%-os, jó prognózisú non-szeminoma esetén (összes non-seminoma eset 56%-a) 92-94%. Közepes prognózisú heretumor esetén (seminoma 5 éves túlélése 72%, NS 83% NS), és még rossz prognózis esetén is 48-71% közötti az 5 éves túlélés {26}.

Tumorelles kezelés hatása a fertilitásra

A kemoterápia gonadotoxikus hatása sokat vizsgált kérdés. A reprodukzív rendszerre legártalmasabb kemoterapeutikumok a nitrogénmustár származékok, mint például a busulfan és melfalan, és az alkiláló szerek, mint például a cyclophosphamid és procarbazin. Kombinált kemoterápiás kezelések, így a vincristin, procarbazin és prednisolon (MOPP), amit Hodgkin-kór esetén alkalmaznak, nagy eséllyel okoznak infertilitást. Más fiatalkori tumoros betegségek kezelésére használt kombinált szerek, mint a Hodgkin-kór esetén adott adriamycin, bleomycin, vinblastin és dacarbazin (ABVD) illetve csírasejtes heretumoros betegeknek alkalmazott bleomycin, etoposid, és cisplatin (BEP) protokoll közepes rizikót jelent a fertilitás megszűnésére vonatkozóan {27}.

A 2. táblázatban egyes kemoterápiás szerek infertilitást okozó hatásának kockázata látható.

Magas rizikó	Közepes rizikó	Alacsony rizikó
Cyclophosphamid Ifosfamid Chlormethin Busulfan Melfalan Procarbazin Dacarbazin Chlorambucil MOPP	Cisplatin Carboplatin Doxorubicin BEP ABVD	Vincristin Methotrexate Dactinomycin Bleomycin Mercaptopurin Vinblastin

2. táblázat A kemoterápiás szerek permanes infertilitást okozó hatás szerinti csoportosítása {27}. (MOPP:nitrogénmustár, vincristin, procarbazine, prednisolon, BEP: bleomycin, etoposide, cisplatin, ABVD: adriamycin, bleomycin, vinblastin, dacarbazin)

A hereszövet, különösen a germinális sejtek érzékeny a sugárkezelésre. 4 Gy-nél nagyobb dózis alkalmazása visszafordíthatatlanul károsítja a csírasejteket, és meddőséget okoz. A Leydig sejtek ellenállóbbak ebben a tekintetben, 20 Gy felett károsodnak {27}.

Általában a heréket sugárkezelés alkalmazása során védik, kivéve csontvelő transzplantációt megelőző egész test besugárzás esetén, illetve heretumor kezelése során.

Krioprezerváció

A fertilitás megőrzésére alkalmas módszer a spermiumok krioprezervációja. A krioprezerváció a biológia anyag -196 celsius fokon való tárolását jelenti, ezen a hőmérsékleten a biokémiai folyamatok leállnak. 1950 óta történik spermium krioprezerváció, 1954-ben jött létre az első terhesség fagyasztott-felolvasztott spermium felhasználásával. A fagyasztva tárolás indikációit, intézeti feltételeit, kizáró körülményeit illetve a tárolást kérő által kitöltendő rendelkezési nyilatkozatot a 30/1998-es, az emberi reprodukcióra irányuló különleges eljárások végzésére vonatkozó, valamint az ivarsejtekkel és embriókkal való rendelkezésre és azok fagyasztva tárolására vonatkozó részletes szabályokról NM rendelet szabályozza (3. táblázat). Az ondófagyasztást minden ejakulációs funkciót illetve spermatogenezist negatívan befolyásoló kezelés megkezdése előtt (kemoterápia, irradiáció, műtét) fel kell ajánlani a betegnek, ez „A” szintű ajánlás {1,25}.

A spermiumok fagyasztva tárolásának javallatai:
<u>Saját célra történő hímvarsejt-fagyasztás:</u> - kemo- és radioterápia előtt, - orvosi indikáció alapján végzett, sterilitást eredményező andrológiai műtétek vagy vazektómia előtt, - a férj közösülési képtelensége esetén, - IVF-ET során, ha a férj/élettárs képtelen a petesejtnyerés időpontjában hímvarsejtet nyerni, - szociális javallat (pl. a férj hosszabb távolléte) esetén.
<u>Spermadonáció céljára történő spermafagyasztás: a donor sperma felhasználásának javallatai szerint.</u>

3. táblázat. A spermiumok fagyasztva tárolás szerinti javallatai hatályos jogszabály alapján {28}

A krioprezerváció és felolvasztás folyamata az ondóminta jellemzőinek romlását okozza. Elsősorban a motilitás és morfológia változik kiolvasztás után. A spermium fagyasztás a motilitást 31%-kal rontja {1}. A legújabb tanulmányok azonban kimutatták, hogy a fagyasztásnak nincs DNS fragmentációt növelő hatása és epigenetikai változásokat sem indukál {29}. Továbbá a fagyasztás nem befolyásolja sem a számbeli kromoszóma rendellenességének frekvenciáját, sem az X és Y kromoszómát hordozó spermiumok arányát {30}.

Az egyetlen hatékony lehetőség a fiatal tumoros betegek fertilitásának megőrzésére a gonadotoxikus kezelés előtti spermium fagyasztás. A fagyasztva tárolt ondót később asszisztált reprodukciós technikák (ART) alkalmazásával lehet felhasználni.

Annak ellenére, hogy ez elérhető és egyszerű módszer a nemzőképesség megőrzésére, mégis csak a betegek 27% használja ki ezt a lehetőséget {31}. Ennek hátterében többnyire az információ hiánya áll. A későbbi felhasználásra az intracitoplazmatikus spermium injekció alkalmazása még nagyobb lehetőséget nyújt. A gyógyult tumoros betegek fagyasztva tárolt mintáinak a felhasználásával végzett ART sikerességi aránya irodalmi adatok szerint 33-56%-os {32, 22}.

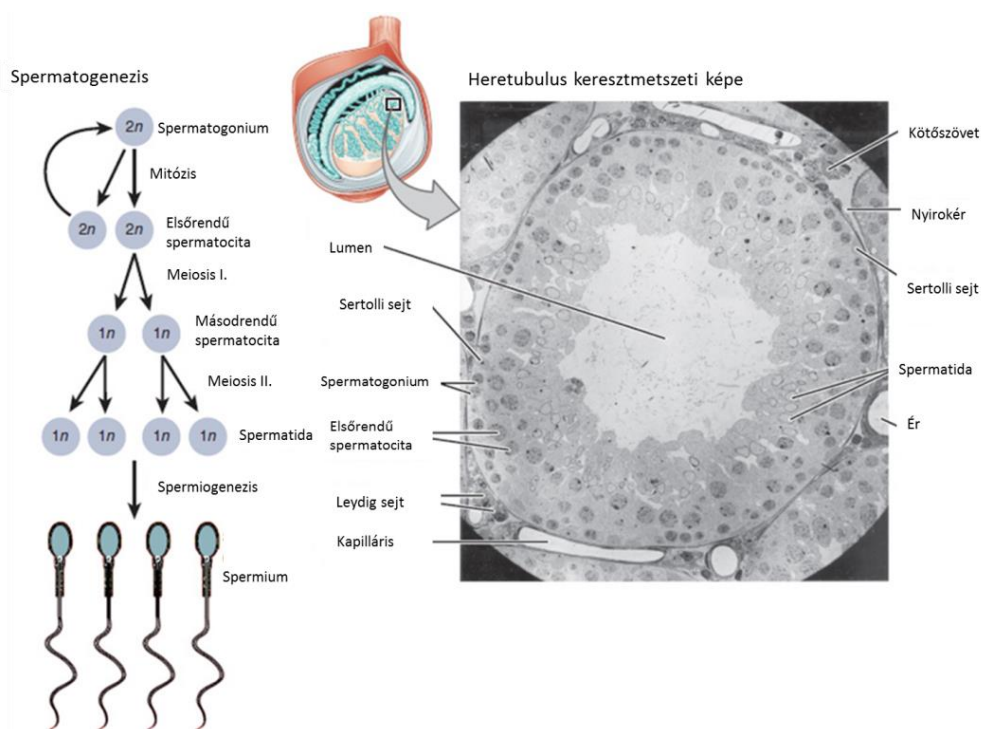
Spermatogenezis és spermium biomarkerek

A spermatogoniumok spermiummá való alakulása a spermatogenezis, mely folyamat három fő fázisra tagolható: spermatocitogenezisre, meiosisra és spermiogenezisre (4.ábra).

A spermatogoniumok osztódása során vagy A típusú, vagy B típusú spermatogonium képződik. Ez utóbbi az elsőrendű spermatocita előalakja {25}.

A spermatogoniumok diploid sejtek, a szomatikus sejtekhez hasonlóan. Az ebből létrejövő elsőrendű spermatocitában zajlik le a meiosis profázisa 22 nap alatt, mely során citoplazmát akkumulál a környezetéből, így a spermatogenezis legnagyobb sejtje lesz.

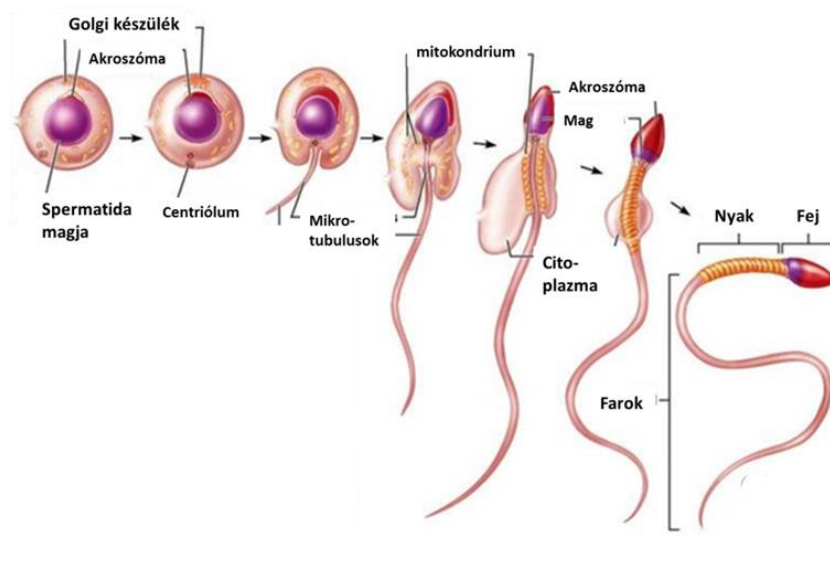
Az első meiotikus osztódás eredményeként jön létre a másodrendű spermatocita. Ezután lezajlik a második meiotikus osztódás, így jön létre a haploid genotípusú spermatida.



4. ábra. A spermatogenezis folyamata. (Forrás: Anatomy and Physiology textbook, OpenStax College, www.cnx.org)

A meiosis egy komplex folyamat, mely során nem történik DNS állomány replikáció, de két sejt képződik. A meiosis folyamatának különböző zavarai különböző kromoszóma abnormalitásokat okozhatnak, mint például aneuploidiát vagy diploidiát. Számbeli kromoszóma rendellenesség (aneuploidia, diploidia) akkor alakul ki, ha a spermium egynél több vagy kevesebb kópiát tartalmaz egy kromoszómából, vagy az egész genomból. Mivel egy kromoszóma aneuploidiája igen alacsony frekvenciával fordul elő, így ajánlott a vizsgálat során 5000 spermiumot értékelni. Csak így lehet megfelelő módon meghatározni a becsült számbeli kromoszóma rendellenességek előfordulási gyakoriságát [33]. A kromoszómák számbeli rendellenességének detektálására tanulmányunkban a multikolor fluorescens in situ hibridizációs technikát alkalmaztuk.

A spermiogenezis során alakulnak át a spermatidák spermiummá (5. ábra). A spermatidák kis kerek, esetleg poligonális sejtek. A spermiogenezisnek négy fázisát különböztetjük meg: Golgi fázis, „cap” fázis, akroszóma fázis illetve érési fázis. A Golgi fázis során az akroszómális granulum kialakulása zajlik. A „cap” fázisra az egyre tömörebbé váló sejtmag kialakulása a jellemző, mely ráfekszik az akroszómális granulumra így kialakítva az akroszómális sapkát. Az akroszóma fázisban az egyre tömörebbé váló sejtmag ellapul, az egész spermatida megnyúlik. Kialakul a spermium nyaki régiója, melyben a centriolum kilenc rosttá való differenciálódása vesz részt. Az érési fázisban a farok rész teljes differenciálódását követően a spermatidáról leválik a reziduális citoplazma [25].



5. ábra. A spermiogenezis folyamata. (Forrás: Pearson Education, Benjamin Cummings, www.pearsoned.co.uk)

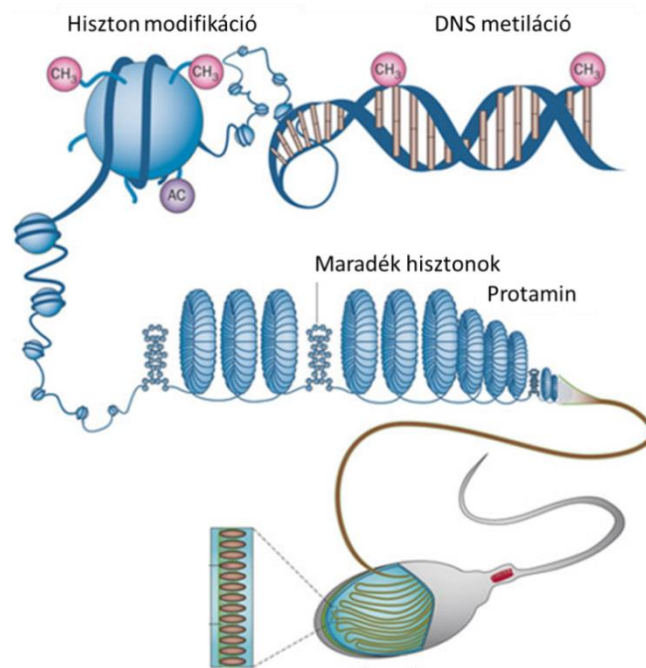
A spermiogenezis legfontosabb eseményei a következőkben foglalhatók össze: mag kondenzáció, akroszóma kialakulás, flagellum formáció, citoplazma redukció és vele együtt zajló sejtmembrán remodelling.

A *mag kondenzáció* során a spermium kromatin állománya 6-10x kompaktabb lesz, mint egy átlagos szomatikus sejté, a sejtmag megnyúlt alakot vesz fel. A hiperkondenzált állapotot

a spermium úgy éri el, hogy a hiszton fehérjéket először átmeneti fehérjék helyettesítik, majd ez protaminra cserélődik ki. Ez az epigenetikai módosítás transzkripcionálisan inaktívvá teszi a genomot (6. ábra). Fiziológiásan a spermium kromatinja 10-15% hisztont fehérjét tartalmaz csak.

Infertilis betegenél a protamin expresszió szignifikánsan alacsonyabb, mint a bizonyítottan fertilis férfiak esetén {34}. Ismert az is, hogy a kromatin kondenzáció zavara jelen lehet morfológiailag ép spermiumok esetén is {35}. Korábbi vizsgálatok kimutatták továbbá a spermium hiszton csere defektusa esetén a megzavart spermium érést {36, 37, 38}.

A károsodott spermiogenezis és a hiszton-protamin csere elmaradása közötti összefüggésre az egyik lehetséges magyarázat az, hogy a spermiogenezis során a hiszton-protamin csere egy olyan kritikus pont, melynek elmaradása, apoptosist indukál. Másik lehetséges magyarázat, hogy ezen epigenetikai módosítás egy eseménysorozatott szabályozó folyamat egyik lépése, melynek zavara komplex spermiogenetikus defektust eredményez {39}. Az anilin kék festékkel a hiszton fehérjék festődnek, így reziduális hiszton detektálásra ezt a módszert használtuk.



6. ábra. A hiszton-átmeneti fehérje-protamin csere mechanizmusa. (Forrás: Nature Reviews Urology 9, 609-619. www.nature.com)

Az *akroszóma kialakul*, amelyben a petesejt penetrációjához esszenciális enzimek (például hialuronidáz) találhatóak.

A *flagellum formáció* az acroszómával ellentétes oldalon zajlik, kialakul a spermium farki része.

A *citoplazma redukciója* során a szükségtelen citoplazma állománytól válik meg a sejt. A *plazmamembrán remodellingje* kapcsán megjelennek a felszínen a hialuronsav kötő receptorok, melyek a petesejt zona pellucidájához való kötődésben, így a fertilizációs képességben játszanak kulcsszerepet [40, 41, 42].

Korábbi vizsgálatok bizonyították, hogy csak az érett, alacsony aneuploidia frekvenciájával és alacsony DNS fragmentációval jellemezhető spermium képes kötődni a hialuronsavhoz [41]. Ezen a megfigyelésen alapuló fertilitási diagnosztikai teszt és spermium szelekciós módszer kereskedelmi forgalomban van. Ezt a fertilizációs potenciált jelző vizsgálatot használtuk funkcionális tesztként tanulmányunkban.

Az andrológia területén az objektív spermium biomarkerek kifejlesztése óriási jelentőségű volt, hiszen megjósolhatóvá vált a spermium fertilizációs képessége, mely a spermium koncentrációtól és motilitástól függetlennek bizonyult. Klinikai tanulmányok igazolták, hogy a kreatin kináz (CK) festéssel kimutatott citoplazma retenció az érési folyamatban megrekedt spermiumot detektálja. Az inszeminációk során a terhességi rátával a CK festődés eredményei korreláltak, nem pedig a spermium koncentráció vagy motilitás. A normál spermium koncentrációjú és motilitású mintákkal végzett sikertelen IVF ciklusok háttérében is a magasabb CK festődési arány igazolódott. A ismeretlen eredetű (unexplained) férfi infertilitás háttérében a spermium éretlensége állhat, melyet azonban nem feltétlenül

okoz eltérés a spermioqramban. A spermium minőségi jellemzésére szolgáló vizsgálatok (fluorescens in situ hibridizáció, anilin kék festés, DNS fragmentációs vizsgálatok, hialuronsav kötődés) eredményei 80%-ban megfelelnek egymásnak, de a spermium koncentrációval illetve motilitással való kapcsolatuk jelentősen gyengébb. Az ugyanazon spermiumon történő különböző biomarker vizsgálatok eredményének egyezése arra mutat, hogy amennyiben a spermium érése zavart szenved, ez strukturális és funkcionális zavart okoz, mind a citoplazmatikus mind a nukleáris kompartmentben {40, 42, 60, 70, 73}. Erre egy lehetséges magyarázat, a spermiumban kifejeződő HspA2 chaperon fehérje többes funkciója. Ez a fehérje a meiosis során, a szinaptonemális komplex kialakításában játszik kulcsszerepet. A spermatogenezisben pedig a DNS repair mechanizmusokat irányító folyamatokban vesz részt {38}.

A heretumoros betegek nemzőképességére vonatkozó vizsgálatok nem teljesek. Bár a napi rutinban is alkalmazott WHO V. szerinti ejakulátum elemzés a nemzőképesség megítélésére még napjainkban is gold standardként számontartott módszer, nagyon fontos ebben a speciális betegcsoportban nem csak a kvantitatív, hanem a kvalitatív elemzések elvégzése is {43, 44, 45}. A tumoros folyamat, illetve az általa triggerelt faktorok spermatogenezisre kifejtett közvetlen hatása sem teljes mértékben tisztázott még.

Célkitűzések

Az értekezésem célja a heretumoros, fertilis korú férfiak spermatogenezisének jellemzése a Debreceni Egyetem beteganyagán, a heredaganatos férfiak fertilitási prognózisának felmérése kérdőíves követéssel, illetve a romló spermatogenezissel kapcsolatban álló genetikai, epigenetikai, funkcionális eltérések felderítése klinikai és kísérletes kutatás segítségével, majd az eredmények interpretálása a mindennapi gyakorlat számára. E célok megvalósításához az alábbi vizsgálatokat végeztem:

1. A heretumor indikációjával fagyasztva tárolt ondóminták spermiogramjának elemzése, eredmények összevetése más, reprodukív korban előforduló tumor esetén tapasztaltakkal.
2. A heretumor miatt krioprezervációt igénybe vevők kérdőíves megkeresése annak felmérése céljából, hogy hogyan változott a családtervezési szándék, mekkora a fagyasztva tárolt minták felhasználási aránya, mi lett az asszisztált reprodukciós eljárás kimenetele, valamint milyen a spontán létrejött terhesség aránya és kimenetele.
3. Normozoospermiás, infertilis és adjuváns kezelés előtt álló heretumoros férfiak ejakulátumának genetikai vizsgálata, a számbeli kromoszóma rendellenességek előfordulási gyakoriságának meghatározása multicolor FISH vizsgálattal.
4. Normozoospermiás, infertilis és adjuváns kezelés előtt álló heretumoros férfiak ejakulátumának epigenetikai vizsgálata, a mag kondenzáció zavara detektálása reziduális hiszton fehérje anilin kék festésével.
5. Normozoospermiás, infertilis és adjuváns kezelés előtt álló heretumoros férfiak ejakulátumának funkcionális vizsgálata, a fertilizációs potenciált jellemző hialuronsav kötődési vizsgálattal.
6. Korrelációs vizsgálat az egyes jellemzők közötti összefüggések felderítésére a tumoros és nem tumoros csoportban.

7. A vizsgálatokban szereplő csoportoktól származó minták vizsgált jellemzőinek összevetése, a spermatogenezisre és fertilitási potenciálra vonatkozó hasonlóságok és különbségek elemzése, klinikai következtetések levonása céljából.

BETEGEK ÉS MÓDSZEREK

1. tanulmány. Spermigram eltérések elemzése heretumoros betegeknél

A Debreceni Egyetem, Szülészeti és Nőgyógyászati Klinika, Andrológiai és Spermium Krioprezervációs Laboratóriumában 10 év alatt spermium fagyasztás céljából megjelent heretumoros (TC), Hodgkin- kóros (HD) és non-Hodgkin-lymphomás (NHD) betegek (n=119) fagyasztás előtti ondómintáit elemeztük.

A betegek kemo-, illetve sugárkezelést az ondóvizsgálat előtt nem kaptak, a heretumoros férfiak semicastratio után voltak. Az ondómintákat 3-5 nap karencia után a WHO 2010. évi irányelvének megfelelően elemeztük {46}.

Az adatok normalitásának vizsgálata Kolmogorov-Smirnov teszttel történt. Statisztikai elemzés során normál eloszlást mutató adatoknál a t-próbát, nem normál eloszlás esetén a Man-Withney U tesztet alkalmaztuk. Statisztikailag szignifikánsnak tekintettük az eltérést, ha a $p < 0,05$ volt.

2. tanulmány. Heretumoros betegek fertilitásának utámkövetése

A Debreceni Egyetem, Szülészeti és Nőgyógyászati Klinika, Andrológiai és Krioprezervációs Laboratóriumában 11 éves időintervallumban heretumor miatt fagyasztva tárolást kérő 86 betegünket kerestük meg kérdőívünkkel. Beleegyező nyilatkozatot töltöttek ki betegeink. A kérdőívek visszaküldési aránya 68,6%-os volt (59/86).

Adatokat gyűjtöttünk a betegeink családi anamnéziséről, a heretumor kezeléséről, heretumor szövettani típusáról gyermekvállalási tervekről, amennyiben terhesség jött létre, úgy azzal kapcsolatos adatokról, fagyasztva tárolt minta felhasználásáról.

3. tanulmány. Spermium funkcionális, genetikai és epigenetikai vizsgálata heretumor esetén

A vizsgálatban részt vevők

Heretumoros betegek (TC)

A Debreceni Egyetem, Szülészeti és Nőgyógyászati Klinikájának, Andrológiai és Krioprezervációs Laboratóriumában spermium fagyasztva tárolás céljából jelentkező 28 heretumoros beteg ondómintáit vizsgáltuk. A betegek orchidectomia után voltak, de kemoterápia illetve sugárkezelés megkezdés előtt.

A heretumoros beteg átlagéletkora 28,9 év volt (18-47 év), az átlag spermium koncentrációt $27,7 \times 10^6/\text{ml}$ -nek ($6-65 \times 10^6/\text{ml}$) találtuk. A TC betegeket a spermium koncentráció alapján két csoportra osztottuk: oligozoospermiás (TCO, $n=8$) (spermium koncentráció $<15 \times 10^6/\text{ml}$) és normozoospermiás (TCN, $n=20$) (spermium koncentráció $>15 \times 10^6/\text{ml}$) csoportra. Szövettani típus alapján seminoma ($n=16$) és non-seminoma ($n=12$) csoportot képeztünk.

Infertilis, oligozoospermiás betegek (IO)

A Debreceni Egyetem, Szülészeti és Nőgyógyászati Klinikájának, Andrológiai és Krioprezervációs Laboratóriumában illetve az Urológiai Klinika, Andrológiai szakrendelésén infertilitás miatt jelentkező 20 oligozoospermiás betegek mintáit vizsgáltuk. A csoport tagjait korban illesztettük a heretumoros betegekhez.

Normozoospermiás férfiak (NZ)

A Debreceni Egyetem, Szülészeti és Nőgyógyászati Klinikájának, Andrológiai és Krioprezervációs Laboratóriumában jelentkező 20 egészséges sperma donor ondómináit

vizsgáltuk. A normozoospermiás betegek csoportját korban illesztettük a heretumoros betegekhez.

Etikai bizottsági engedély

A tanulmányba való részvétel előtt részletes írásbeli és szóbeli tájékoztatás történt. Minden résztvevő írásbeli tájékoztatást kapott, bejegyző nyilatkozatot írt alá. Intézeti etikai bizottsággal rendelkezünk a vizsgálatunk végzéséhez (referencia szám: DEOEC RKEB/IKEB: 2736/2008 and 2976/2012-EHR)

Vizsgálati Módszerek

Spermium analízis

Az ejakulátum 2-4 nap karencia után került leadásra. Az elemzést manuálisan, a World Health Organisation hatályos irányelvei alapján végeztük (4. táblázat) {46}.

	Referencia határ
Térfogat	1,5 ml
Spermium koncentráció	15x 10 ⁶ /ml
Össz spermium szám	39 x10 ⁶
Össz motilitás	40%
Progresszív motilitás	32%
Élő spermium	58%
Normál morfológiájú spermium	4%

4. táblázat. Spermigram értékek referencia határa {46}

Fluorescens in situ hibridizációs (FISH) vizsgálat

Az ondómintákból keneteket készítettünk, ezeket metanol és ecetsav 3:1 arányú keverékével 10 percig fixáltuk, majd 70, 85 és 98%-os etanol sorozatban dehidráltuk. A FISH vizsgálat elvégzéséig -20 °C-on tároltuk a keneteket. A dekondenzációhoz a szobahőmérsékletű tárgylemezeket 10 mmol/l ditiotritol (DTT, Sigma) + 0,1 mmol/l Tris-HCl (pH 8,0) oldattal, majd 10 mmol/l lítium-dijódszalicilát (LIS, Sigma) + 0,1 mmol/l Tris-HCl oldattal kezeltük. A dekondenzálás teszi a spermium kromatinját a DNS specifikus próbák számára hozzáférhetővé. A következő lépés a dehidráció, melyet 70, 85 és 95%-os etanol sorozattal végeztünk.

A spermiumok FISH vizsgálatához triple-color FISH próbát alkalmaztunk. Az aneuploidia meghatározásához az irodalomban elfogadott ajánlás szerint három kromoszóma számbeli eltérését vizsgáljuk, a 17-es (D17Z1, SpectrumAqua), az X- (DXZ1, SpectrumOrange) és az Y-kromoszóma (DYZ1, SpectrumGreen) (Abbott/Vysis) centromerájához kötődő próbák segítségével.

A FISH-vizsgálat a próbákat gyártó cég által javasolt protokoll szerint történt.

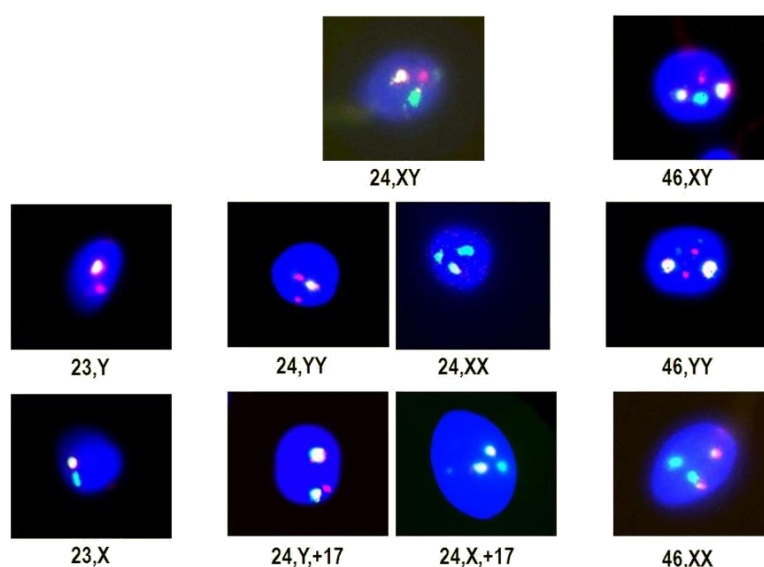
A próba és a minta denaturációja 76 °C fokon történt 3 percig. A hibridizáció nedves kamrában, 36 °C fokon 16-18 órán keresztül zajlott (Hybrite, Abbott/Vysis, Des Plaines, IL, USA). A hibridizáció utáni mosást 50% formamid/2X natrium citrát (SSC) oldatokkal végeztük 42 °C fokon 15 percig. A tárgylemezeket ezt követően 2X SSC oldattal öblítettük le szobahőmérsékleten, 10 percig, majd 2X SSC/ 0.1 % NP -40 oldattal 5 percig.

Mosás után a sejtmagot 4'-6' diamidino-2 - phenilindol (DAPI) festékkel festettük meg (Abbott/Vysis, Des Plaines, IL, USA).

A spermiumok kromoszóma rendellenességének meghatározásához kenetenként 5000 spermiumot elemeztünk. Az átlagos hibridizációs hatékonyság >98%-os volt. A vizsgálat értékeléséhez Zeiss Axioplan2 (Carl Zeiss, Jena, Germany) fluorescens mikroszkópot és ISIS szoftvert (Metasystems, Althussheim, Germany) használtunk.

A 17-es autoszómát választottuk az autoszómális rendellenességek detektálásához, mert ezen kromoszóma aneuploidia frekvenciája megegyezik az összes autoszóma átlagos aneuploidia frekvenciájával (0.12%) {33, 47, 48, 41, 49}.

A spermiumok értékelése során az irodalomban használt kritériumokat alkalmaztuk {50}. Az általánosan elfogadott eljárás szerint, a nulliszómiát nem értékeltük, mivel a szignál hiánya lehet nulliszómia illetve hibridizációs hiba miatt is. Azon sejtmagokat, amik átfedtek egymással illetve nem volt bennük szignál kihagytuk az elemzésből.



7. ábra. Spermiumok értékelése multicolor FISH vizsgálat során

A spermiumot diszómiásnak tekintettük, ha a fejben ugyanazon színű fluoreszcens szignálból kettő egyforma méretűt és intenzitását láttunk, egymástól legalább egy szignálnyi távolságra, ugyanabban a síkban nézve. Diploidia során minden szignálból kettőt detektáltunk, a fenti kritériumok teljesülése mellett (7. ábra).

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

A: autoszómális diszómia frekvencia

B: nemi kromoszóma diszómia frekvencia

C: diploidia gyakoriság

D: a minta **becsült számbeli kromoszóma aneuploidia** gyakoriságai

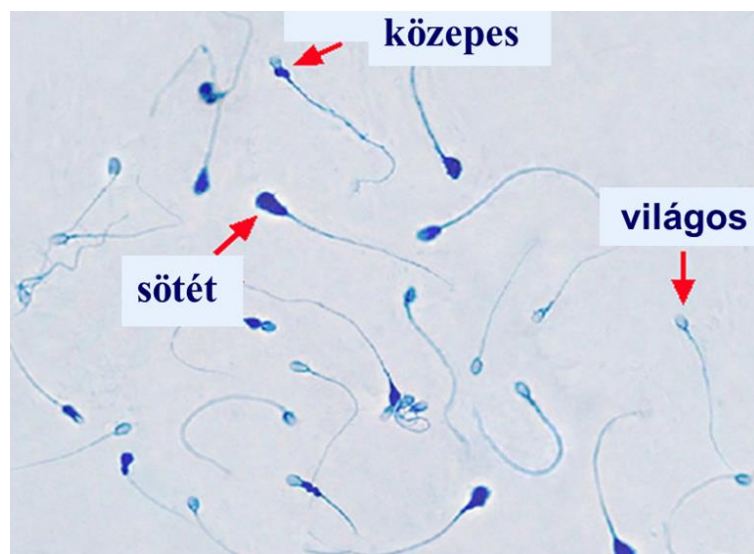
8. ábra. A becsült számbeli kromoszóm rendellenesség számolására alkalmazott képlet

A spermium diszómia frekvencia és a becsült kumulatív aneuploidia frekvencia számítása az irodalomban elfogadottak szerint történt (8. ábra) {47}.

Anilin kék festés (AB festés)

Az ejakulátumból kenet készítettünk. Ecetsavval 3,5-es pH értékre beállított, 5%-os anilin kék festékben (Sigma Co., St. Louis, MO, USA) festettük a tárgylemezeket 5 percig, majd csapvízzel leöblítettük, szobahőmérsékleten való száradás után értékeltük a spermiumokat {40}. Az érett spermiumban a hiszton fehérjék kicserélődnek protaminokra, ezek a spermiumok világosan festődnek. A részleges cserén átesett sejtek közepes festődést mutatnak, míg a nagymértékben zavart szenvedett spermiumok sötétre festődnek. A halvány festődés érett spermiumot, a közepes festődés érésében károsodott spermiumot, a sötét festődés pedig éretlen spermiumot jelez (9. ábra).

Kenetenként minimum 200 spermium került értékelésre 100x objektívvel, olajimmerziós nagyítással, fénymikroszkóppal.



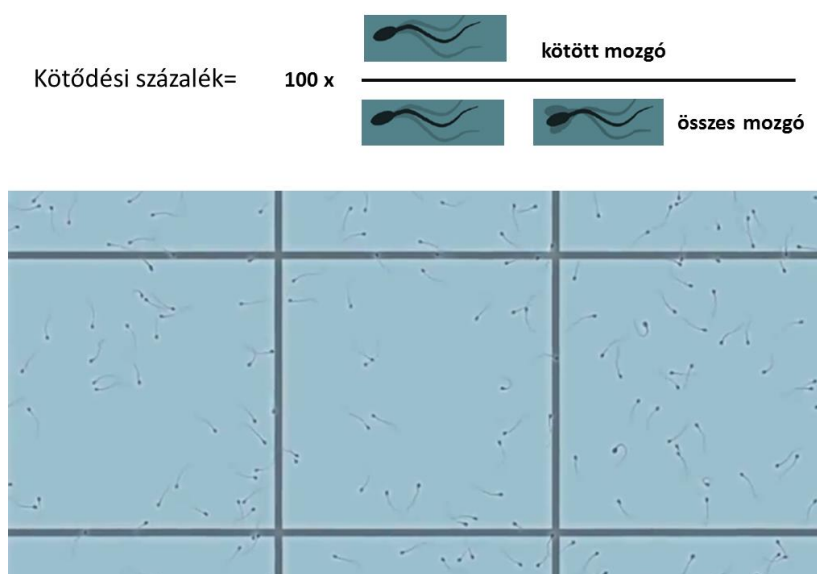
9. ábra. Anilin kék festés spermiumon

A spermiumot érettnek, normálnak értékeltük amennyiben halványan festődött anilin kékkel. A közepes és sötét festődést mutató spermiumokat kórosnak tekintettük. Az eredmény a festődő és nem festődő sejtek százalékos értékében adtuk meg. Azt az ejakulátumot tartjuk normálnak, melyben a festődő sejtek aránya < 20%-nál {51}.

Spermium hialuronsav kötődési vizsgálat (HBA teszt)

Az ejakulátum szobahőmérsékleten történő elfolyosódása után 3 órán belül végeztük a HBA tesztet (MidAtlantic Diagnostics, Marlton, NJ, USA). Az ondómintából 10 µl-t a hialuronsavval bevont lemez közepére pipettáztunk. Ráhelyeztük a CELL-VU fedőlemez. A teszt leírásának megfelelően minimum 10, de nem több mint 20 percig szobahőmérsékleten inkubálódott a minta. Ez alatt az idő alatt történik meg a spermiumok hialuronsavhoz való kötődése. Az értékelés fénymikroszkóppal történik, 100x nagyítás alatt.

A kötött motilis és nem kötött motilis spermiumot számoltuk meg. A kötődési százalékot megkapjuk, amennyiben a kötött motilis spermiumok számát osztjuk az összes motilis spermium számmal, majd szorozzuk 100-zal (10. ábra).



10. ábra Spermiumok hialuronsavhoz való kötődésének vizsgálata

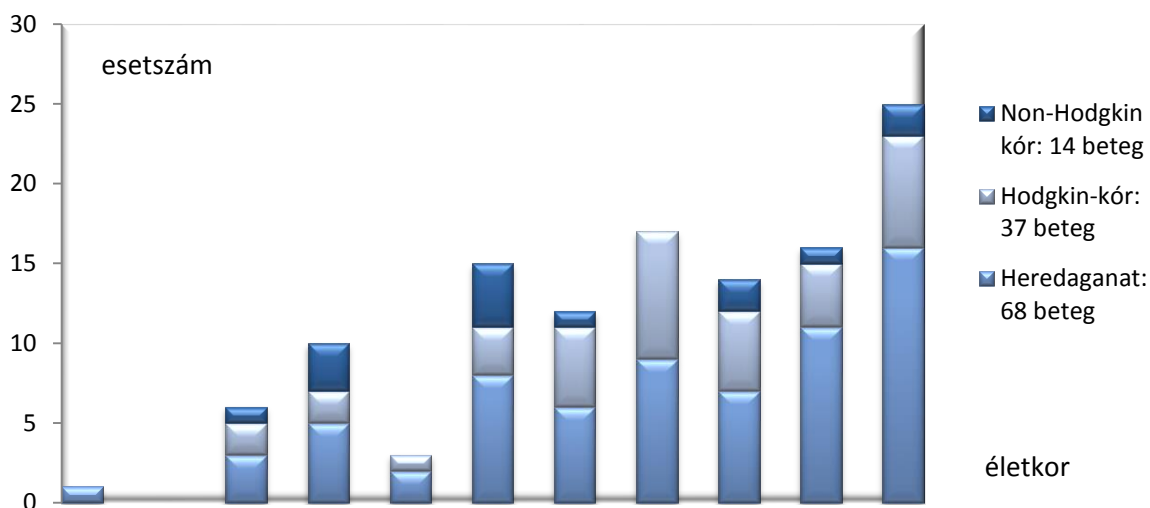
Statisztikai analízis

Az adatok normalitásának vizsgálata Kolmogorov-Smirnov teszttel történt. A legtöbb adat nem normál eloszlást mutatott, ezek elemzéskor a Mann-Whitney U tesztet, normál eloszlást mutató adatok összehasonlítása során t-próbát alkalmaztuk. A korrelációk vizsgálatakor Spearman rho-t számítottunk. Statisztikailag szignifikánsnak a 0,05-nél kisebb p értékeket tartottuk. Minden statisztikai számítást SPSS Statisztikai szoftver 22,0-es verziójával végeztünk (IBM Corps., Armonk, NY, USA).

EREDMÉNYEK

1. tanulmány. Spermogram eltérések elemzése heretumoros betegeknél.

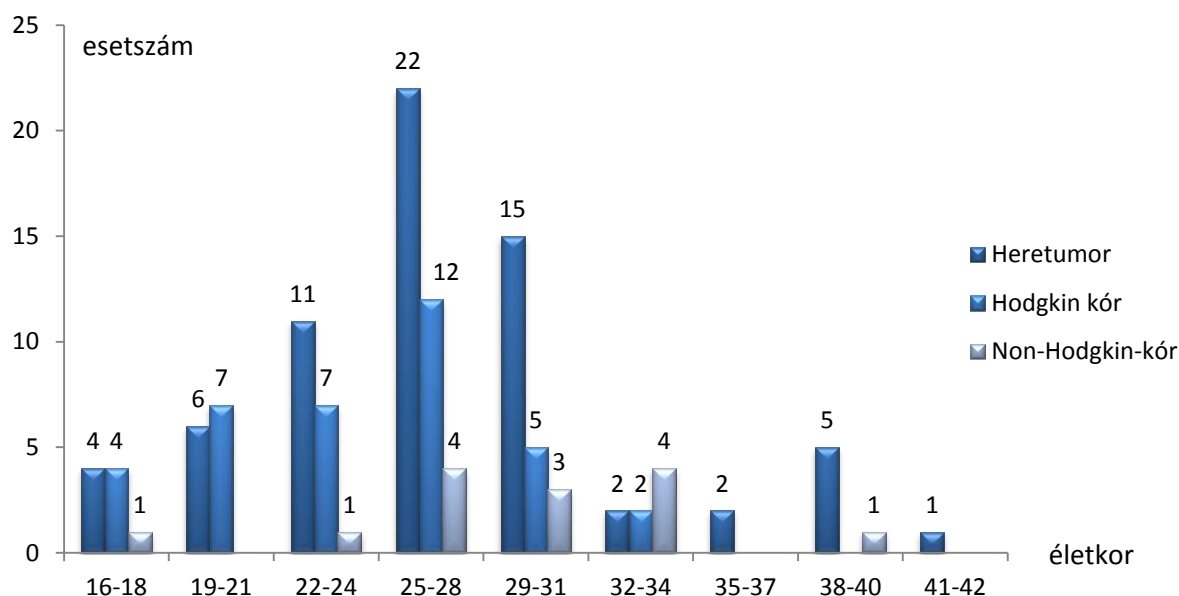
A vizsgált 10 éves periódusban 119 betegnek történt onkológiai javallatú spermium fagyasztás és tárolás. A vizsgálat a kemoterápia, illetve a sugárkezelés megkezdése előtt történt. A vizsgált 11 éves periódusban a spermium fagyasztást kérők száma dinamikusan nőtt. Az utolsó évben 25 onkológiai javallatú spermium fagyasztás történt (11. ábra).



11. ábra. A 11 év alatt a fagyasztva tárolások számának évenkénti változása betegcsoportonként

A betegek 57%-a (n=68) heretumoros (TC) volt, átlagéletkoruk a betegség diagnosztizálásakor 22,7 év (16-42), a medián 27 év. Hodgkin-kór (HD) miatt történt a fagyasztások 31%-a (n=37), a betegek átlagéletkora 24,6 év (17-34). Non-Hodgkin-lymphomás (NHD) volt betegeink 12%-a (n=14), átlagéletkor 28,6 év (17-39). Betegeink életkori megoszlása a 12. ábrán látható. A férfiak 69%-a (n=82) nem töltötte be a 30. életévét a tumoros betegség diagnosztizálásakor.

Statisztikailag szignifikáns eltérést találtunk a heretumoros és a Hodgkin-kóros (22,7 év versus 24,6 év; $p=0,01$) valamint a heretumoros és non-Hodgkin-kóros betegek (22,7 év versus 28,6 év; $p=0,003$) életkora között, ugyanakkor nem volt statisztikailag szignifikáns a különbség a Hodgkin-kóros és non-Hodgkin-kóros betegek kora között (24,6 év versus 28,6 év; $p=0,17$).



12. ábra A laboratóriumunkban fagyasztásra jelentkező heretumoros, Hodgkin-kóros és non-Hodgkin-kóros betegek életkori megoszlása

Az ondóminták jellemzőit tüntettük fel a 5. és 6. táblázatban. A TC betegek közül 9-nek (13,2%), a HD csoportban 4 betegnek (10,8%), a NHD csoportban 1 betegnek (7,2%) nem volt spermium az ejakulátumában, vagyis már a tumorellenes kezelés megkezdése előtt azoospermiásak voltak. Ezekben az ondómintákban a spermium koncentráció $0 \times 10^6/\text{ml}$, ami miatt ezen betegeket a további elemzés során külön csoportba soroltuk, vagyis az oligozoospermiás betegek között nem szerepelnek az azoospermiás betegek adatai. A spermium koncentráció átlagának számításánál szintén fontosnak tartottuk kihagyni az azoospermiás betegeket, hiszen a 0-ás érték beszámolása lefelé torzította volna adatainkat.

	Életkor (átlag)	Azoo-spermia		Nomrozoo-spermia ($>15 \times 10^6/\text{ml}$)		Oligozoo-spermia ($<15 \times 10^6/\text{ml}$)		Alacsony össz-spermium szám ($<39 \times 10^6/\text{ml}$)		Sperm. konc. ($\times 10^6/\text{ml}$) (átlag)
		n	%	n	%	n	%	n	%	
Heretumor (TC) n=68	22.7 (16-42)	9	13.2%	21	30,9%	38	55,9%	35	51.5%	24,9 (1-75)
Lymphoma (HD+NHD) n=51	25.8 (17-39)	5	10%	14	27%	32	63%	23	45%	32.8 (1-110)
Összes n=119	26.6 (17-42)	14	11.8%	35	29,4%	70	58,8%	58	48.7%	28.3 (1-110)

5. táblázat. Heretumoros, és lymphomás betegek ondómintáinak jellemzői, tumorelles kezelés megkezdése előtt

A minták 29,4%-ának (n=35) spermium koncentrációját a WHO referenciaérték ($15 \times 10^6/\text{ml}$) felettinek találtuk. TC esetén ez a betegek 30,9%-át (n=21), HD esetén 29,7%-át (n=11) míg NHD esetén 21,4%-át (n=3) jelentette. Az oligozoospermias betegek aránya a TC csoportban 55,9% (n=38), a HD csoportban 59,5% (n=22) és a NHD csoportban 71,4% (n=10) volt. A teljes spermium szám (spermium koncentráció x ondótérfogát) alapján a minták 48,7%-a (n=70) került a referenciahatár (39×10^6 spermium/ejakulátum) alá. A spermium koncentráció (az azoospermias betegek kivétele után) a TC csoportban $24,9 \times 10^6/\text{ml}$, a HD csoportban $30,9 \times 10^6/\text{ml}$, a NHD csoportban pedig $37,4 \times 10^6/\text{ml}$ volt. Minden érték referencia érték feletti.

	Életkor (átlag)	Azoo-spermia		Nomrozoo-spermia ($>15 \times 10^6/\text{ml}$)		Oligozoo-spermia ($<15 \times 10^6/\text{ml}$)		Alacsony össz-spermium szám ($<39 \times 10^6/\text{ml}$)		Sperm. konc. ($\times 10^6/\text{ml}$) (átlag)
		n	%	n	%	n	%	n	%	
Hodgkin kór (HD) n=37	24.6 (17-34)	4	10.8%	11	29,7%	22	59,5%	20	54,0	30,9 (1-76)
Non-Hodgkin kór (NHD) n=14	28.6 (17-39)	1	7.2%	3	21,4%	10	71,4%	3	21,4	37,4 (1-110)

6. táblázat. Hodgkin-kóros és Non-Hodgkin-kóros betegek spermogramjának jellemzői, tumorelles kezelés megkezdése előtt

A legalacsonyabb spermium koncentrációt a heretumoros betegek között találtuk, itt volt az azoospermiás betegek aránya is a legmagasabb. Spermium koncentráció szempontjából szignifikáns különbséget találtunk a heretumoros és NHD betegek között ($37,4 \times 10^6/\text{ml}$ vs. $24,9 \times 10^6/\text{ml}$; $p=0,03$), nem volt szignifikáns a különbség a Hodgkin-kór és non-Hodgkin-kóros betegek között ($30,9 \times 10^6/\text{ml}$ vs. $37,4 \times 10^6/\text{ml}$; $p=0,22$), és a Hodgkin-kóros és heretumoros betegek spermium koncentrációja között sem ($30,9 \times 10^6/\text{ml}$ vs $24,9 \times 10^6/\text{ml}$; $p=0,09$).

A lymphomás betegekből egy csoportot képezve a spermiumkoncentráció tekintetében szignifikáns különbséget kaptunk a heretumoros csoporthoz képest ($32,8 \times 10^6/\text{ml}$ vs. $24,9 \times 10^6/\text{ml}$; $p=0,03$).

A heretumoros betegek közül 45 esetben állt rendelkezésünkre szövettani diagnózis. Ez alapján a képeztük a seminoma ($n=19$, 42%) és non-seminoma ($n=26$, 58%) csoportot. Az 5. táblázatban tüntettük fel az eredményeket. A seminoma csoportban szignifikánsan magasabb a spermium koncentráció ($26,11 \times 10^6/\text{ml}$ vs. $21,5 \times 10^6/\text{ml}$; $p<0,02$), de több az azoospermiás esetek aránya is (7 . táblázat).

	Térfogat (ml)	Sperm. konc. ($\times 10^6/\text{ml}$) (átlag)	Össz spermium szám ($\times 10^6$)	Nomrozoo- spermia ($>15 \times 10^6/\text{ml}$) n %		Oligozoo- spermia ($<15 \times 10^6/\text{ml}$) n %		Azoo- spermia n %	
Seminoma (n:19)	2,84	26,1	72,2	10	52,7%	5	26,3%	4	21%
Non-seminoma (n:26)	2,6	21,5	62,7	8	30,8%	15	57,7%	3	11,5%

7. táblázat. Heretumoros ($n=45$) betegek adatai szövettani csoportosítás szerint

2. tanulmány. Heretumoros betegek fertilitásának utánkövetése

A kérdőívünkre választ adó 59 páciensünk átlagos életkora 27 év (16-41 év) volt a fagyasztás igénybevételekor, 32 év (21-47 év) a tanulmányunk végzésekor. A betegek 71%-a (n=42) 30 év alatti volt a kérdőív kitöltésekor. A kérdésre, hogy voltak-e, illetve vannak-e családtervezési tervei a heretumor kezelése óta, 53% (n=31) választot igennel. A reprodukzív tervek fennállásának idejéről nincs adatunk. Természetes úton 13 beteg párjánál jött létre terhesség, asszisztált reprodukciós technikát fagyasztva tárolt spermium felhasználásával 7 pár vett igénybe.

A természetes úton fogant összesen 18 terhesség átlagosan 4,4 évvel (1-10 év, medián: 3,5 év) a kezelés megkezdése után jött létre. A 18 terhességből 4 végződött spontán vetéléssel a 12. terhességi hét előtt. Ezek közül egy ikerterhesség volt. Két nem kívánt terhesség esetén pedig terhességmegszakítás történt. Az további 12 terhesség élveszüléssel végződött, 8 leány és 4 fiú újszülött született

Nr.	Diagnózis óta eltelt évek	Terhesség	Vetelés	Szülés	Fagyasztás-kori spermium koncentráció ($\times 10^6/\text{ml}$)	Szövettan	Kezelés
1.	3	1	-	1	30,8	non-seminoma	kemoterápia
2.	10	1	-	1	30,6	non seminoma	kemoterápia
3.	3,4,6	3	1	2	16,6	seminoma	irradiáció
4.	3	1	-	1	39,2	seminoma	irradiáció
5.	3,8,9	3	2	1	47,5	seminoma	irradiáció
6.	6	1	1	-	18	seminoma	irradiáció
7.	4	1	-	1	7	non-seminoma	kemoterápia
8.	1,3	2	-	2	40	seminoma	irradiáció
9.	5	1	-	1	<1	seminoma	irradiáció
10.	5	1	1	-	15,6	non-seminoma	kemoterápia
11.	1	1	-	1	16,5	seminoma	kemoterápia
12.	3	1	1	-	14	non-seminoma	kemoterápia
13.	3	1	-	1	25	seminoma	irradiáció

8. táblázat. Spontán fogant terhességek jellemzői

Azon betegek fagyasztáskori spermium paramétereit elemeztük, akiknél spontán terhesség jött létre. A betegek közül 7-nek 20 x10⁶/ml, 3-nak 15 x10⁶/ml alatti volt a fagyasztáskori spermium koncentrációja. Egy esetben pedig súlyos oligozoospermia volt jelen, vagyis a spermium koncentráció kevesebb volt, mint 1 x10⁶/ml. Két terhesség is a heretumor diagnózisa után 1 évvel jött létre, a kemoterápia illetve a sugárkezelés után még egy év sem telt el (8. táblázat). A fagyasztott óndómintát 7 beteg (11,9%) használta fel in vitro fertilizációs technikához. Az átlagos tárolási idő 4,1 év (1-9 év, medián: 3 év) volt. A fagyasztott minta felhasználásával 6 terhesség jött létre, 4 élveszüléssel (2 leány, 2 fiú) és 2 pedig az első trimeszter során spontán vetéléssel végződött. Az így született gyermekeknél nem ismert fejlődési rendellenesség vagy nagyobb megbetegedés (9. táblázat).

Nr.	Diagnózis óta eltelt évek	Terhesség	Vetélés	Szülés	Fagyasztáskori spermium koncentráció (x10 ⁶ /ml)
1.	9	1	-	1	< 1
2.	1	1	-	1	39
3.	9	1	-	1	6,8
4.	4	1	1	-	< 1
5.	2	1	1	-	21
6.	3	1	-	1	60
7.	1	-	-	-	1,4

9. táblázat. A fagyasztva tárolt minta felhasználásánál eredményei in vitro fertilizáció során

3. tanulmány. Spermium funkcionális, genetikai és epigenetikai vizsgálata heretumor esetén – eredmények

Spermiogram elemzésének eredményei

A tanulmányban szereplő betegek spermiogram eredményeiről táblázatot készítettünk, mely elsősorban a heretumoros betegcsoport jellemzésére szolgál (10. táblázat). a normozoospermiás csoportnak minden paramétere a referencia érték feletti. Az infertilis,

oligozoospermiás csoportba olyan betegeket válogattunk, akiknek a morfológia és motilitás referencia határ feletti, tehát csak a spermium koncentráció csökkent.

	Heretumoros betegek(TC)			Infertilis, oligozoospermiás betegek (IO)	Normozoospermiás (NZ)
	Összesen	Normozoospermiás (TCN)	Oligozoospermiás (TCO)		
N (esetszám)	28	20	8	20	20
Életkor (év)	28,9 (18-47)	29,7 (18-47)	27,1 (21-34)	27,1 (21-34)	29,7 (18-47)
Spermium koncentráció ($\times 10^6/\text{ml}$)	27,7 (6-65)	35,0 (18-65)	9,6 (6-14)	7,2 (1-14)	73,4 (18-160)
Térfogat (ml)	3,3 (0,8-7,2)	3,1 (1,1-7,2)	3,7 (0,8-5,7)	3,8 (1,5-7,0)	3,1 (1,5-6,0)
Össz spermium szám ($\times 10^6$)	86,3 (11,2-417,6)	108 (28,6-417,6)	32,2 (11,2-57,0)	28,4 (3,0-84,0)	222,7 (46,8-576,0)
Morfológia (%)	7,1 (0-16)	8,5 (3-16)	3,8 (0-6)	7,0 (4-15)	12,7 (4-28)
Progresszív motilitás (%)	27,6 (12-53)	29,9 (13-53)	22,0 (12-35)	34,9 (32-39)	43,6 (33-71)
Össz motilitás(%)	41 (23-70)	44 (23-70)	33,8 (26-47)	50 (42-68)	62,2 (42-88)
Össz motilis spermium szám ($\times 10^6$)	35,8 (5,3-111,7)	45,9 (8,6-111,7)	10,3 (5,3-16,5)	14,3 (1,7-50,4)	134,6 (24,8-350,8)

10. táblázat. A vizsgált csoportok spermiogram jellemzői (átlag, tartomány)

Számbeli kromoszóma rendellenességek vizsgálata FISH módszerrel

A FISH vizsgálatok eredményeit a 11. táblázatban foglaltuk össze. A 68 személy mintájában összes 342 000 spermiumot értékeltünk, betegenként átlagosan 5 030-at.

Az X/Y hányados minden csoportban 1:1-hez közeli volt. A magasabb 17-es kromoszóma diszómia frekvenciát találtunk a IO csoportban a TC és NZ csoporthoz képest, ez a becsült számbeli kromoszóma rendellenességekben is megmutatkozott. Becsült számbeli kromoszóma rendellenességek tekintetében szignifikáns különbséget találtunk az IO és NZ csoport ($p < 0.001$), az IO és TCO csoport TCO ($p = 0.008$) valamint az IO és TCN csoport

($p < 0.001$) eredményei között, ugyanakkor nem különbözött a NZ és TC, TCO és TCN, NZ és TCN, NZ és TCO csoportokban (11. táblázat). A NZ csoport eredményei nem különböztek az oligozoospermiás heretumoros betegekétől sem nemi kromoszóma diszómiában, sem 17-es kromoszóma diszómiában sem becsült kromoszóma rendellenességek előfordulási gyakoriságában.

	Heretumoros betegek(TC)			Infertilis, oligozoospermiás betegek (IO)	Normozoospermiás (NZ)
	Összesen	Normozoospermiás (TCN)	Oligozoospermiás (TCO)		
N (esetszám)	28	20	8	20	20
X/Y arány	1,05 (1,00-1,08) ^{a,b}	1,04 (1,01-1,08) ^d	1,04 (1,0-1,07) ^{c,e}	1,07 (1,01-1,17) ^{a,d,e}	1,07 (1,03-1,10) ^{b,c}
Nemi kromoszóma diszómia (%)	0,37 (0,24-0,52) ^a	0,37 (0,24-0,52)	0,37 (0,26-0,44) ^b	0,43 (0,21-0,54) ^{a,b,c}	0,35 (0,22-0,44) ^c
XY diszómia	0,15 (0,06-0,20)	0,14 (0,06-0,20)	0,15 (0,06-0,18)	0,19 (0,09-0,25)	0,15 (0,11-0,18)
XX diszómia	0,12 (0,08-0,18)	0,12 (0,08-0,18)	0,12 (0,08-0,14)	0,13 (0,05-0,17)	0,11 (0,07-0,15)
YY diszómia	0,09 (0,06-0,14)	0,09 (0,06-0,14)	0,09 (0,06-0,12)	0,10 (0,04-0,15)	0,08 (0,04-0,15)
17,17 diszómia	0,07 (0,02-0,14) ^a	0,06 (0,02-0,10) ^b	0,08 (0,02-0,14) ^c	0,11 (0,04-0,15) ^{a,b,c,d}	0,08 (0,05-0,11) ^d
Összes diploidia (%)	0,15 (0,06-0,24) ^{a,b}	0,14 (0,06-0,24) ^d	0,17 (0,11-0,24) ^{c,e}	0,32 (0,07-0,47) ^{a,d,e,f}	0,19 (0,12-0,36) ^{b,c,f}
XY diploidia	0,07 (0,04-0,14)	0,07 (0,38-0,10)	0,08 (0,05-0,14)	0,15 (0,05-0,21)	0,09 (0,06-0,14)
XX diploidia	0,05 (0,02-0,08)	0,04 (0,19-0,08)	0,05 (0,02-0,08)	0,11 (0,02-0,15)	0,07 (0,04-0,12)
YY diploidia	0,03 (0,01-0,08)	0,03 (0,01-0,08)	0,04 (0,02-0,06)	0,07 (0,01-0,13)	0,04 (0,02-0,10)
Becsült számbeli kromoszóma rendellenesség (%)	3,89 (1,52-7,20) ^a	3,60 (1,64-5,62) ^b	4,61 (1,52-7,20) ^c	6,19 (2,50-8,21) ^{a,b,c,d}	4,17 (2,82-5,87) ^d

11. táblázat. A fluoreszcens in situ hibridizáció eredményei. Vizsgált paraméterenként minden csoportot összehasonlítottunk, ahol szignifikáns különbséget találtunk

($p < 0.05$), ott ugyanazzal a betűvel jelöltük meg a csoportokat. (A táblázatban átlagértékek és tartományok szerepelnek)

Anilin kék festés eredményei

Az anilin kék festés eredményeit a 12. táblázatban foglaltuk össze. A 68 személy mintájában összesen 15 564 spermiumot értékeltünk, betegenként átlagosan 229-et. Az AB festődő sejtek aránya 16,9% volt a normozoospermiás, 45,7% az oligozoospermiás, 23% a heretumoros, 19,9% a TCN valamint 30,7% a TCO csoportban. A különbséget szignifikánsnak találtuk az IO és NZ ($p < 0,001$), IO és TC ($p < 0,001$), IO és TCO ($p < 0,001$), TCO és TCN ($p = 0,028$), NZ és TCO ($p = 0,005$) és a IO és TCO ($p = 0,011$) csoportok között. Nem volt különbség a NZ és TC valamint az NZ és TCN csoport eredményei között.

A 20 normozoospermiás férfi mintái közül 2-nek (10%) volt 20%-nál több AB-val festődő spermium arány értéke (48,6% és 24,6%), ezen minták spermium koncentrációja $18 \times 10^6/\text{ml}$ and $26 \times 10^6/\text{ml}$ volt. Az IO csoportban minden minta AB festődési százaléka a normál érték feletti volt (28-68%). A heretumoros csoportban a AB festődési arány 5-53% közötti volt, normál eredményt 17 esetben (60,7%) találtunk.

	Heretumoros betegek(TC)			Infertilis, oligozoospermiás betegek (IO)	Normozoospermiás (NZ)
	Összesen	Normozoospermiás (TCN)	Oligozoospermiás (TCO)		
N (esetszám)	28	20	8	20	20
AB festődő sejtek aránya (%)	23.0 (5-53) ^a	19.9 (5-47) ^{b,d}	30.7 (11-53) ^{b,c,e}	45.7 (23-69) ^{a,d,e,f}	16.9 (7-49) ^{c,f}

12. táblázat Anilin kék (AB) festődés eredményei. Minden csoportot összehasonlítottunk, ahol szignifikáns különbséget találtunk ($p < 0.05$), ott ugyanazzal a betűvel jelöltük meg a csoportokat. (A táblázatban átlagértékek és tartományok szerepelnek)

Spermium hialuronsav kötődési vizsgálat eredményei

A normozoospermias csoportban átlagosan a mozgó spermiumok 81,1%-a, az oligozoospermias csoportban a 41,9%-a, és heretumoros csoportban a 56,9%-a kötődött a hialuronsavhoz. A TCN csoportban ez a 60,9%, a TCO csoportban pedig 46,8% volt. A HBA teszttel meghatározott kötődési százalék a normozoospermias csoportban magasabbnak bizonyult mind az infertilis, oligozoospermias csoportnál ($p < 0,001$), mind a heretumoros csoportnál ($p < 0,001$).

Az IO csoport azonban alacsonyabb kötődési százalékot mutatott, mint a heretumoros csoport ($p = 0,019$). A különbség az IO és TCO ($p = 0,007$), NZ és TCN ($p < 0,001$) és az NZ és TCO csoport ($p = 0,001$) között volt szignifikáns (13. táblázat). Nem különböztek a TCO és TCN csoportok valamint a IO és TCN csoport eredményei.

A normozoospermias csoportban csak 2 minta (10%) kötődési százaléka volt a kritikus 60% alatti (55% és 58%), ez a két minta volt a szinte két legalacsonyabb ($26 \times 10^6/\text{ml}$ és $30 \times 10^6/\text{ml}$) spermium koncentrációjú is. Az infertilis, oligozoospermias csoportban 16 minta (80%), a heretumoros csoportban 10 minta (35,7%) esetében találtunk alacsony kötődési százalékot.

	Heretumoros betegek(TC)			Infertilis, oligozoospermias betegek (IO)	Normozoospermias (NZ)
	Összesen	Normozoospermias (TCN)	Oligozoospermias (TCO)		
N (esetszám)	28	20	8	20	20
Hialuronsav kötődés (%)	56,9 (8-87) ^{a,b}	60,9 (10-87) ^c	46,8 (8-70) ^{d,e}	41,9 (0-68) ^{a,e,f}	81,1 (55-95) ^{b,c,d,f}

13. táblázat. Hialuronsav kötődés eredményei. Minden csoportot összehasonlítottunk, ahol szignifikáns különbséget találtunk ($p < 0,05$), ott ugyanazzal a betűvel jelöltük meg a csoportokat. (A táblázatban átlagértékek és tartományok szerepelnek)

Szövettan alapján történő csoportosítás eredményei

A heretumoros csoportot szövettani eredmény alapján két csoportra osztottuk, seminoma (n=16) és non-seminoma (n=12) csoportra.

A két csoport között nem találtunk különbséget életkorban (30,4 év versus 27,1 év; $p=0,16$), spermium koncentrációban ($31,4 \times 10^6/\text{ml}$ versus $22,7 \times 10^6/\text{ml}$; $p=0,226$), X/Y arányban (1,05 versus 1,1; $p=0,982$), nemi kromoszóma diszómiában (0,37 versus 0,4; $p=0,214$), 17-es kromoszóma diszómiában (0,07 versus 0,1; $p=0,599$), össz diploidiában (0,14 versus 0,15; $p=0,19$), becsült számbeli kromoszóma rendellenességben (3,86 versus 3,93; $p=0,239$), HS kötődési százalékban (57 versus 57%; $p=0,45$) és AB festődő sejtek arányában (21 versus 26%; $p=0,133$) sem (14. táblázat).

	Heretumoros betegek(TC)		
	Összesen	Seminoma	Non-seminoma
N (esetszám)	28	16	12
Életkor (év)	28,9 (18-47)	30,4 (18-47)	27,1 (21-33)
Spermium koncentráció ($\times 10^6/\text{ml}$)	27,7 (6-65)	31,4 (6-65)	22,7 (7-52)
X/Y arány	1,05 (1,00-1,08)	1,05 (1,01-1,08)	1,1 (1,00-1,08)
Nemi kromoszóma diszómia (%)	0,37 (0,24-0,52)	0,37 (0,24-0,52)	0,4 (0,26-0,44)
17,17 diszómia	0,07 (0,02-0,14)	0,07 (0,02-0,14)	0,1 (0,02-0,11)
Összes diploidia (%)	0,15 (0,06-0,24)	0,14 (0,06-0,24)	0,15 (0,08-0,24)
Becsült számbeli kromoszóma rendellenesség (%)	3,89 (1,52-7,20)	3,86 (1,64-7,2)	3,93 (1,52-5,61)
Hialuronsav kötődési százalék	56,9 (8-87)	57 (32-82)	57 (8-87)
Anilin kék festődő sejtek aránya	23 (5-53)	21 (7-41)	26 (5-53)

14. táblázat. Heretumoros betegek szövettani típus szerinti csoportosítása, és az eredmények. Szignifikáns különbséget nem találtunk.(A táblázatban átlagértékek és tartományok szerepelnek)

Korrelációs analízis eredményei

A vizsgált paraméterek közötti korreláció elemzéséhez a IO és NZ csoportból kontroll csoportot alkottunk, így a spermium koncentráció széles spektrumát kapjuk ($1-160 \times 10^6/\text{ml}$). A spermium koncentráció, becsült kromoszóma rendellenesség, hialuronsav kötődési százalék és anilin kék festődő sejt arány közötti korrelációs analízist a kontroll csoporton és a heretumoros csoporton is elvégeztük.

A kontroll csoportban statisztikailag szignifikáns ($p < 0,001$) korrelációt találtunk a spermium koncentráció és HS kötődés (Spearman $\rho = 0,842$), a becsült számbeli kromoszóma rendellenességek (Spearman $\rho = -0,642$) és AB festődő sejtek aránya között (Spearman $\rho = -0,876$); valamint a becsült számbeli kromoszóma rendellenesség és a HS kötődés (Spearman $\rho = -0,678$) és a AB festődő sejtek aránya között (Spearman $\rho = 0,559$); továbbá a HS kötődés és AB festődő sejtek aránya között (Spearman $\rho = -0,811$) (13. ábra).

Kontroll csoport (NZ+IO)	Spermium koncentráció	Becsült számbeli kromoszóma rendellenesség	Hialuronsav kötődési százalék	Anilin kék festődés
Spermium koncentráció	o	-0,642*	0,842*	-0,876*
Becsült számbeli kromoszóma rendellenesség		o	-0,678*	-0,559*
Hialuronsav kötődési százalék			o	-0,811*

15. táblázat. Korrelációs vizsgálattal talált korrelációs együtthatók a vizsgált paraméterek között a kontroll (IO+NZ) csoportban (*= $p < 0.001$)

A heretumoros csoportban ezzel szemben csak a spermium koncentráció és a becsült számbeli kromoszóma rendellenességek között találtunk szignifikáns összefüggést (Spearman $\rho = -0,642$). A többi általunk vizsgált paraméter között nem tudtunk szignifikáns korrelációt kimutatni (16. táblázat).

Heretumoros csoport (TC)	Spermium koncentráció	Becsült számbeli kromoszóma rendellenesség	Hialuronsav kötődési százalék	Anilin kék festődés
Spermium koncentráció	o	-0,646*	0,248	-0,342
Becsült számbeli kromoszóma rendellenesség		o	-0,233	0,212
Hialuronsav kötődési százalék			o	-0,189

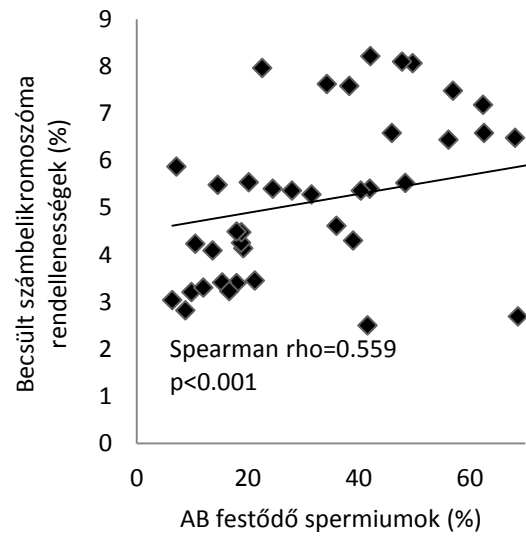
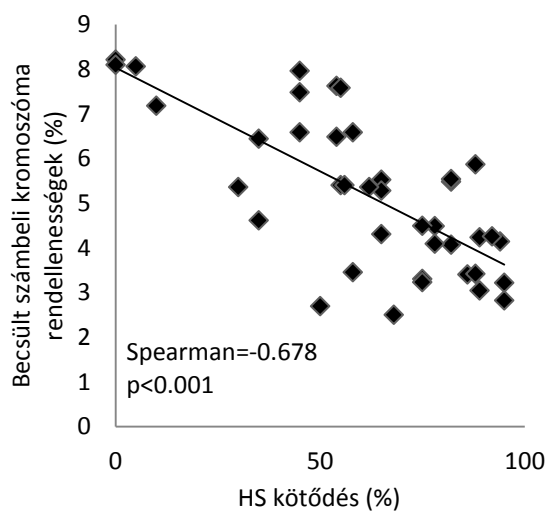
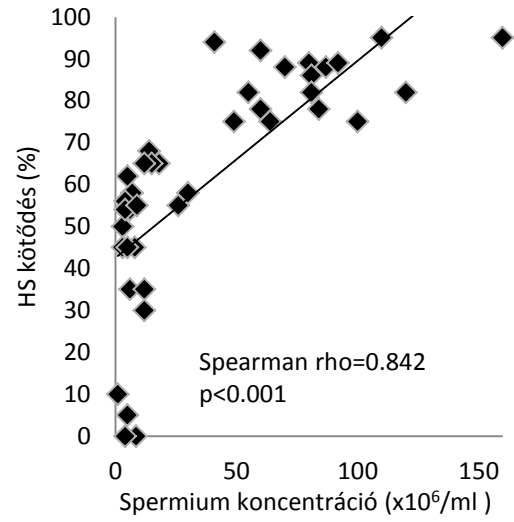
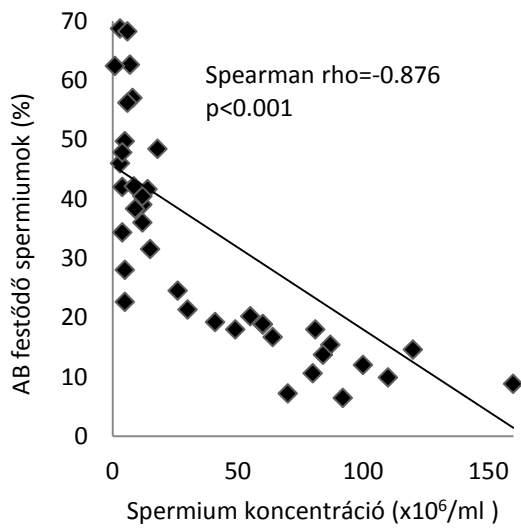
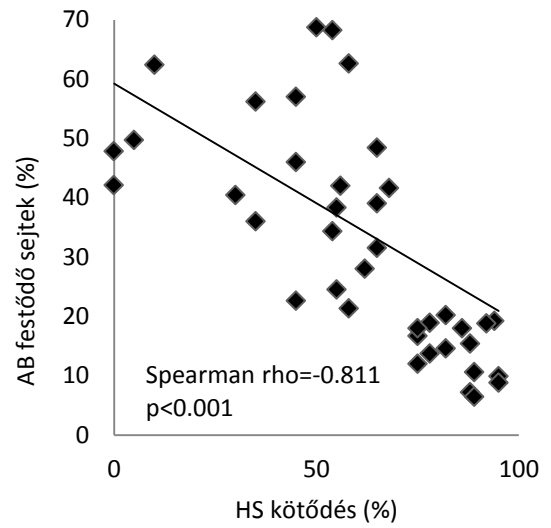
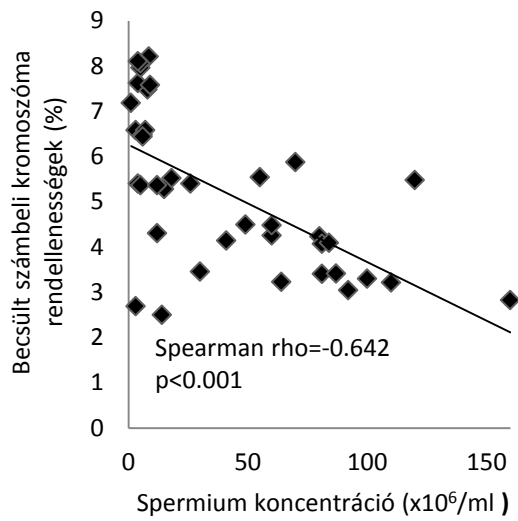
16. táblázat. Korrelációs vizsgálattal talált korrelációs együtthatók a vizsgált paraméterek között a heretumoros (TC) csoportban (*= $p<0.001$)

Anilin kék festődés különböző eredményei (világosan, közepesen és sötéten festődő sejtek aránya) és a spermium koncentráció, becsült számbeli kromoszóma rendellenesség és hialuronsav kötődési százalék közötti összefüggések vizsgálatát is elvégeztük.

Szignifikáns ($p<0,005$) korrelációt találtunk minden AB festődési paraméter és általunk vizsgált más értékek között, de a legerősebb az irodalmiban használnak megfelelően az anilin késsel festődő sejtekkel volt.

Kontroll csoport (IO+NZ)	Spermium koncentráció	Becsült számbeli kromoszóma rendellenesség	Hialuronsav kötődési százalék
Világosan festődő sejtek	0,876*	-0,559*	0,811*
Közepesen festődő sejtek	-0,876*	0,432*	-0,703*
Sötéten festődő sejtek	-0,765*	0,538*	-0,781*
Festődő sejtek (sötét+közepes festődés)	-0,876*	0,559*	-0,811*

17. táblázat. Az anilin kék festődés eredményei és a spermium koncentráció, becsült számbeli kromoszóma rendellenesség és hialuronsav kötődési százalék közötti összefüggések vizsgálata (*= $p<0,005$)



13. ábra. Korreláció az anilin kék (AB) festődő sejtek százalékos aránya, a spermium koncentráció, a becsült számbeli kromoszóma rendellenesség aránya és a hialuronsav (HS) kötődési százalék között a kontroll (NZ+IO) csoportban.

MEGBESZÉLÉS

A heretumoros betegek spermioqramjának elemzése alapján elmondható, hogy a spermatogenezis már a tumorellenes kezelés megkezdése előtt zavart szenved, melyet az ejakulátum mennyiségi mutatóinak csökkenése jelez. A vizsgált anyagunkban az onkológiai javallatú spermium fagyasztásra jelentkező betegek 11,8%-a azoospermiás volt a betegség diagnózisakor. Bár a kezelés utáni fertilitás nem jósolható meg a kezelés előtti spermium paramétereiből, de a kezelés megkezdése előtt jelentkező azoospermia nem jelent jó prognózist.

A daganatos betegség miatt spermium krioprezervációra jelentkező betegek átlagéletkora 26,6 év, ezek közül a heretumoros betegek átlagéletkora 22,7 év volt. Magyarországon 2011-ben a nők átlagosan 28,3 évesen szülték az első gyermeküket {60}. A férfiak életkoráról ilyen adat nem áll rendelkezésre. A 2008-ben apává vált férfiak átlagéletkora 32,8 év {61}. Mindazonáltal jól tükrözik ezek az adatok a fertilitás megőrzésnek fontosságát a vizsgált betegcsoportban. A fiatal tumoros betegek családtervezése sokszor el sem kezdődött, és ha igen, akkor sem zárult még le.

Az onkológiai javallatú (heretumor, Hodgkin-kór, non-Hodgkin-kór miatt történt) spermium fagyasztáskor tapasztalt spermioqram elemzése során a legrosszabb adatokat a heretumoros betegek csoportjában kaptuk. Az azoospermiás betegek aránya ebben a csoportban a legmagasabb, és az azoospermiás betegek kihagyásával számolt spermium koncentráció átlagát is itt találtuk a legalacsonyabbnak.

A különböző csoportokban az átlagos spermium koncentráció a referencia határ feletti volt, de ezek az értékek mind elmaradnak az átlagpopulációétól. Fontos továbbá az is, hogy csak az 1 millió/ml feletti spermium koncentrációjú betegek adatát használtuk a spermium koncentrációk átlagának kiszámításához.

Az össz spermium számot elemezve azt láthatjuk, hogy a referencia értéként megadott 39 Milló spermium/ejakulátum értéktől a heretumoros és Hodgkin-kóros betegek több mint fele elmarad.

A spermium koncentrációt tekintve a heretumoros betegek értéke a legrosszabb, szignifikánsan alacsonyabb, mint a non-Hodgkin-kórosoké, de nem különbözik statisztikailag szignifikáns módon a Hodgkin-kóros csoporttól. Itt a szövettan szerinti, illetve a betegség stádiuma szerinti elemzéstől várhatunk további magyarázatot, de sajnos ilyen adatok nem minden beteg esetén álltak rendelkezésünkre.

Bár a spermatogenezis defektusa már a daganatos betegség felismerésekor igazolható, a nemzőképesség megőrzésére napjainkban az egyetlen, biztonságosan alkalmazható, effektív módszer a spermium fagyasztás. A tumorelles kezelés gonadotoxicitása illetve a páciens jövőbeli fertilitása nem jósolható meg. Emiatt minden fertilis korú, malignus betegségben szenvedő férfit tájékoztatni kell a kezelés lehetséges mellékhatásairól, és a spermium fagyasztva tárolás lehetőségéről {1}.

Az általunk talált eredményeket irodalmi adatok is alátámasztják. Chung és munkatársai szerint a heretumoros betegek 28%-a, a Hodgkin-kóros betegek 27%-a oligozoospermiás a betegség diagnózisakor {52}. Más tanulmányok azt találták, hogy a Hodgkin-kóros betegek ejakulátum paraméterei 47-67%-ban térnek el a normáltól. Nem tudtak összefüggést kimutatni a betegség stádiuma és az ejakulátum jellemzői között {53}. Van Casteren 764 fiatal, különböző tumoros megbetegedésben szenvedő férfi adatait dolgozta fel, és azt találta, hogy a heretumoros betegeknek szignifikánsan alacsonyabb volt a spermium koncentrációjuk, mint más tumoros betegeké {32}. Más közlések szerint a spermium krioprezervációra jelentkező tumoros betegek 9,7-17,3%-a már a diagnózisakor azoospermiás {29}.

A kérdőíves vizsgálatunk eredményei alapján elmondhatjuk, hogy a fagyasztva tárolt minták felhasználása 11,9%-os volt, mely az irodalomba leírt 4,7- 12,5%-os adatok között magasnak tekinthető {54, 55, 56}.

Gyermekvállalási szándékról 31 gyógyult heredaganatos beteg számolt be a kérdőívet visszaküldők közül (31/59, 53%). Természetes úton 13 férfi partnerének fogant összesen 18 terhessége. A terhességig átlagosan eltelt idő 4,4 év volt. ART-ra 7 beteg (7/31; 22,5%) fagyasztva tárolt mintája került felhasználásra. Irodalomban fellelhető adatok szerint a heretumor diagnosztizálásától az első gyermek születéséig átlagosan eltelt idő 7 év. Az esetek 5-22%-ban van szükség asszisztált reprodukciós technika igénybevételére {32, 57}. Egy, a heretumor kezelése után létrejött spontán terhességi arányról is beszámoló tanulmányban 218 beteg közül 20 partnerénél jött létre természetes úton terhesség (9,17%), a betegek 7,5%-a használta fel a fagyasztva tárolt mintát, és ez a beavatkozás 49%-ban végződött élveszüléssel {32}. Az eddigi legnagyobb multicentrikus tanulmány arról számol be, hogy a heretumoros betegek a fertilitása 91-ről 67%-osra csökken a tumorelles kezelés után {58}. A fertilitásnak a terhességi ráta illetve a terhességig eltelt idő jó mérőszámai, de ebben a speciális betegcsoportban azt sem szabad figyelmen kívül hagyni, hogy a heredaganatból meggyógyult betegek csak egy harmada szeretne gyermeket {59}.

A heretumor diagnózisakor tapasztalt rossz spermogram jellemzők melletti 11,9%-os fagyasztott spermium felhasználás, valamint a jónak ítélt spontán terhességi arány (13/31, 42%) szemben állnak egymással. Azokat a mintákat elemezve ahol később spontán terhesség jött létre megállapíthatjuk, hogy a fagyasztáskori spermium koncentráció széles spektrumon mozog ($<1 \times 10^6/\text{ml}$ – $47,5 \times 10^6/\text{ml}$), egy esetben $1 \times 10^6/\text{ml}$ alatti, három esetben $15 \times 10^6/\text{ml}$ alatti 7 esetben $20 \times 10^6/\text{ml}$ alatti volt. A kezelés utáni fertilitás nem jósolható meg a kezelés előtti spermium paraméterekből, hiszen más tényezők is szerepet játszanak a nemezőképesség esetleges csökkenésében.

Eredményeink alapján fontosnak tartottuk a spermiumok nem csak mennyiségi, hanem minőségi jellemzését is, kísérletes munkánk ezt hivatott vizsgálni. Tudomásunk szerint eddig ilyen nagy esetszámú heretumoros csoporton nem történt a kezelési előtti ejakulátum ilyen széles körű vizsgálata, mely nem csak a konvencionális spermigram eredményét elemezte, hanem kiegészítette genetikai, epigenetikai és funkcionális vizsgálattal is. Továbbá a tumor hatásának vizsgálata céljából az így kapott eredményeket nem csak egészséges, normozoospermiás kontroll csoporthoz, hanem infertilis, oligozoospermiás betegcsoporthoz is hasonlítottuk. A szövettani típus szerinti elemzést is elvégeztük.

Az eredményeink azt mutatják, hogy nincs különbség a heretumoros és normozoospermiás betegek spermiumában X/Y arány, nemi kromoszóma diszómia, 17-es kromoszóma diszómia, diploidia és becsült számbeli kromoszóma rendellenesség szempontjából, bár a spermium koncentráció és HS kötődési százalék eredményei szignifikánsan rosszabbak a heretumoros csoportban.

Továbbá, az aneuploidia frekvencia és anilin kék festés eredménye akkor sem különbözött, ha az oligozoospermiás heretumoros csoport eredményeit vetettük össze a normozoospermiással. A normozoospermiás heredaganatos és oligozoospermiás heredaganatos csoport között a spermium koncentrációban és anilin kék festődés eredményében találtunk eltérést. Minden általunk vizsgált minőségi jellemző rosszabbnak bizonyult az infertilis, oligozoospermiás csoportban, mint a heretumoros csoportban. Ha az oligozoospermiás heretumoros alcsoportot hasonlítom az infertilis, oligozoospermiás csoporthoz, a különbségek akkor sem tűnnek el.

Az infertilis, oligozoospermiás és normozoospermiás csoportokból kialakított kontroll csoport vizsgálati eredményei között szignifikáns korrelációkat találtunk. A spermium koncentráció korrelált az aneuploidia aránnyal, a HS kötődési százalékkal, az anilin kék festés eredményével; a HS kötődési százalék kapcsolatot mutatott az anilin kék festéssel valamint a

becsült számbeli kromoszóma rendellenességekkel. Szignifikáns, de gyengébb kapcsolatot tudtunk kimutatni az anilin kék festődés és aneuploidia között, mely eredményt alátámasztja az a megfigyelés, mi szerint a kromatin kondenzációja befolyásolja a sejthez a FISH vizsgálat során használt próba hibridizációját, így hímivarsejtek egy populációja nem vizsgálható {62}.

A korrelációs vizsgálatunk eredménye megfelel az eddig publikált eredményeknek, miszerint nem tumoros betegek spermium koncentrációja, aneuploidia frekvenciája és fertilizációs potenciálja (HS kötődési képesség) egymással összefüggő jellemzői az ejakulátumnak {49, 63}. Ezzel ellentétben a heretumoros csoport eredményei között csak egy szignifikáns korrelációt tudtunk kimutatni (a spermium koncentráció és becsült számbeli kromoszóma rendellenesség között). Ez azt jelenti, hogy a spermium koncentráció nem jelzi előre a spermiumok minőségi mutatóit ebben a betegcsoportban. Ezen megállapítás további bizonyítást igényel.

A heretumor és infertilitás hátterében napjainkban közös etiológiát feltételeznek (testicularis dysgenesis syndrome) {19}. Lehetséges magyarázata a heretumoros és normozoospermiás csoport közötti spermium koncentráció különbségnek az intratesztikuláris változások (tumor által kiváltott helyi gyulladás, gyulladásos citokinek és más faktorok emelkedett szintje, a here műtete miatti helyi szöveti trauma) és a környezeti tényezők (betegség, kezelés miatti stressz) következtében kialakuló spermatogenetikus defektus. Ennek eredményeként a TC betegek ejakulátumának mennyiségi mutatóiban észlelt csökkenés nem feltétlenül jár együtt minőségi romlással is, mint például spermium aneuploidia vagy mag kondenzációs zavar.

Korábban leírták, hogy a spermatogenezis a heretumorhoz közelebbi részén a herének nagyobb fokban károsodott, mint a tumortól távol eső területen vagy az ellenoldali herében {64}. A periférián vagy a kontralaterális herében jelen lévő ITGCN szintén oka lehet a spermatogenezis károsodásának. A heretumoros betegek ellenoldali heréjében az esetek 5%-

ban van jelen ITGCN, mely szignifikáns kapcsolatban áll a csökkent spermatogenezissel és tesztikuláris atrófiával {8,9}.

Sok tanulmány jelent meg ami a tumoros betegek kezelés előtti rossz onkódominanciáját írja le {13, 14, 15, 16}. Egy Hollandiában végzett felmérés, amelybe 764 tumoros férfit vontak be azt találta, hogy az 64%-ban az ejakulátum kóros paraméterekkel bír, és az összes tumoros beteg közül a heretumoros betegek (n=292) bírnak a legalacsonyabb spermium koncentrációval {65}. A vizsgálatunkban azt találtuk, hogy heretumor esetén bár alacsonyabb az átlagos spermium koncentráció ($27,7 \times 10^6/\text{ml}$) mint az egészséges normozoospermiás csoportban, de az értéke a referencia határ feletti.

Egy francia nemzeti tanulmány 1158 heretumoros férfi adatait elemezte. Azt találta, hogy az azoospermia és súlyos oligozoospermia fennállása független a tumor szövettani típusától illetve a betegség stádiumától. Ugyanakkor a spermium koncentráció és az össz spermium szám alacsonyabb a betegség III. stádiumában, itt sem volt a szövettani típus befolyásoló hatása kimutatható. Ez is azt a feltételezést támasztja alá, miszerint elsődlegesen a tumor mérete van hatással a spermatogenezisre {66}.

A krioprezerváció egy effektív, megbízható és elérhető módja a fertilitás megőrzésének. A fagyasztva tárolt ejakulátumot később asszisztált reprodukcióra fel lehet használni. Az eredményeink azt mutatják, hogy a heretumoros beteg mintái, mely a kemoterápia illetve a sugárkezelés megkezdése előtt kerülnek lefagyasztásra, nem hordoznak emelkedett rizikót számbeli kromoszóma rendellenességek tekintetében, akkor sem, ha a spermium koncentráció alacsony. Megfigyeltük még, hogy a normozoospermiás illetve oligozoospermiás heretumoros betegek mintái között nincs különbség a minőségi mutatókban (aneuploidia, fertilizációs potenciál, mag kondenzáció). Ezt támasztja alá a tumoros betegektől származó, fagyasztott spermiumot felhasználásával történő ART során elért 33-56%-os sikerességi arány {32, 22}. Azt is leírták, hogy a fagyasztás és fagyasztva tárolás

folyamata nem befolyásolja a spermiumok becsült számbeli kromoszóma rendellenességek előfordulási arányát {30}.

Egy munkacsoport a muticolor FISH módszerrel detektált spermium aneuploidia frekvenciát hasonlította össze 5 kezelés előtt álló heretumoros betegnél, és ezeket normozoospermiás kontrollokkal hasonlította össze, de nem kalkulált becsült számbeli kromoszóma rendellenességet {67}. A tanulmányunkban ezzel szemben nem csak nagy esetszámban vizsgáltuk a tumoros betegeket, hanem egészséges és csökkent fertilitású betegekkkel is összevetettük a talált eredményeinket.

Bár még nem teljesen tisztázott, hogy a malignus betegség van-e hatással a spermium genomiális integritására, de az eredményeink is alátámasztják azt a korábbi vizsgálatot, melyben a spermium DNS integritását vizsgálták 98 tumoros betegen és egészséges donorokon, és nem találtak különbséget a két csoport eredményei között {68}. Különböző metodikák állnak rendelkezésre a spermium DNS fragmentáció megítélésére, mint például az akridin narancs festés, az SCSA esszé (sperm chromatin structural assay-SCSA), a TUNEL esszé (terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated nick-end labeling-TUNEL), és a comet esszé. Stáhl és munkatársai heretumoros betegek spermiumának DNS integritását vizsgálták TUNEL és SCSA assayk alkalmazásával, eredményeik szerint a fagyasztásra kerülő ondóminta nem hordoz emelkedett DNS fragmentációs arányt {69}. Yagci és munkatársai akridin narancs festést használtak kísérleteik során és korrelációt találtak a fertilizációs potenciált jelző HS kötődési százalék és a DNS integritás között {70}.

Az általunk végzett vizsgálatban a HS kötődési százalék alacsonyabb volt a heretumoros csoportban a normozoospermiához képest. Továbbá a HS kötődés eredményei nem korreláltak a spermium koncentrációval a tumoros csoportban. Ezek alapján azt feltételezzük, hogy a fertilizációs potenciál a heretumoros betegeknél nem becsülhető meg a spermium koncentrációból. Továbbá az alacsony spermium koncentráció illetve HS kötődési

százalék nem feltétlenül jelez a tumoros csoportban emelkedett aneuploidia frekvenciát vagy zavart mag kondenzációt.

Azt találtuk, hogy az anilin késsel festődő spermiumok aránya nem különbözött az normozoospermiás és heredaganatos csoportban, de szignifikánsan magasabb volt az infertilis, oligozoospermiás csoportban. Összefüggést találtak a magasabb festődési arányt mutató ejakulátumok és a habituális vetélések {71} valamint az infertilitás között {37, 72}. Korábban kimutatták, hogy a hialuronsavhoz kötődő spermiumok érettek, nem tartalmaznak perzisztáló hiszton fehérjéket a normálisnál magasabb arányban, illetve nem hordoznak számbeli kromoszóma rendellenességet sem {40, 41}.

A tanulmány gyengeségei közé tartozik az egyéb zavaró tényezőkre (dohányzás, környezeti, munkahelyi ártalom) való korrigálás hiánya. Nem áll rendelkezésünkre adat társbetegségek és andrológiai betegségekről.

Új megállapítások

1. A heretumor indikációjával fagyasztva tárolt ondóminták spermiogramjának elemzése során azt találtuk, hogy a tumorelles kezelés megkezdése előtt a betegek nyolcada (13,2%) azoospermiás, több mint fele (55,9%) oligozoospermiás, és csak közel harmada (30,9%) normozoospermiás. Összeségében a betegek kétharmadának (64,7%) alacsony az össz spermium száma. A heretumor miatt tárolt minták (n=68) jellemzőit összevetve a lymphoma miatt tárolt mintákéval (n=51), a heretumoros csoportban a spermium koncentráció szignifikánsan alacsonyabbnak adódott, mint a lymphomás csoportban ($24,9 \times 10^6/\text{ml}$ vs. $32,8 \times 10^6/\text{ml}$).
2. A heretumor miatt krioprezervációt igénybe vevők kérdőíves megkeresése során megállapítottuk, hogy az 59 válaszadó többségének (53%) gyermekvállalási igénye jelentkezett a heretumor kezelése után. Ezen párok közel felénél (42%) fogant spontán terhesség, közülük hárman (23%) több gyermeket is nemzettek. A terhességig eltelt átlagos idő 4,4 év volt. Fagyasztva tárolt mintát 7 férfi használta fel asszisztált reprodukciós eljárás végzéséhez, melyek eredménye 6 terhesség és 4 élveszülés volt. A felhasználásig átlagosan eltelt idő 4,1 évnek adódott. A fagyasztva tárolt minták felhasználása 11,86%-os, mely irodalmi adatok között magasnak számít, ugyanakkor heretumor kezelését követően a fertilitási prognózis, bár széles egyéni variációkkal, jónak mondható.
3. Heretumoros betegek kemoterápia, illetve sugárkezelés előtti spermiumának becsült számbeli kromoszóma rendellenesség frekvenciája nem különbözik a normozoospermiás férfiakétól, az infertilis, oligozoospermiás csoport eredményeitől pedig szignifikánsan jobb. A különbség megmarad akkor is, ha csak az alacsony spermium koncentrációjú heretumoros mintákat vetjük össze az infertilis, oligozoospermiás csoporttal.

4. Heretumoros betegek anilin kék festéssel detektált mag kondenzációja nem különbözik a normozoospermias csoporttól, szignifikánsan jobb, mint az infertilis, oligozoospermias csoporté. A heretumoros csoporton belül azonban az az oligozoospermias és normozoospermias minták között különbséget mutattunk ki. Az oligozoospermias heretumoros és infertilis, oligozoospermias minták eredményei között nem volt különbség mag kondenzációs zavar tekintetében.

5. A heretumoros csoportban hialuronsav kötődési vizsgálattal meghatározott fertilizációs képesség alacsonyabb volt a normozoospermias csoportéhoz képest, de jobb volt az infertilis, oligozoospermias csoporténál. Az oligozoospermias heretumoros csoport eredményei is jobbnak bizonyultak az infertilis, oligozoospermias csoporttól.

6. Az egyes paraméterek közötti összefüggések vizsgálatára végzett korrelációs vizsgálattal azt találtuk, hogy a nem tumoros csoportban (kontroll csoport, mely az normozoospermias és infertilis, oligozoospermias csoportok összevonásával jött létre) szignifikáns kapcsolat van a spermium koncentráció, a becsült kromoszóma aneuploidia frekvencia, az anilin kék festődés eredményei között és a hialuronsav kötődés között. A legerősebb kapcsolatot a spermium koncentráció és kromatin kondenzáció, a spermium koncentráció és fertilizációs potenciál, valamint a fertilizációs potenciál és kromatin kondenzáció között igazoltunk. Heretumoros csoportban a vizsgált paraméterek között nem találtunk ilyen erős összefüggést. A spermatogenezis defektusa oligozoospermiaival társult heretumorban és infertilitásban különböző, heretumor esetén elsősorban a a spermium éréshez köthető fertilizációs potenciál csökkenése érvényesül, míg férfi infertilitásban ezen túl emelkedett aneuploidia frekvenciával és kromatin dekonzenzációval is jár.

7. Eredményeink alapján a heretumoros betegeknél jelen lévő oligozoospermia nem jár az infertilis betegeknél megfigyelt romló minőségi változásokkal, a heretumoros beteg esetén nem jelent fokozott számbeli kromoszóma rendellenességet vagy mag kondenzációs zavart. A

hialuronsav kötődéssel jellemezhető fertilizációs potenciál a normozoospermiás mintákhoz képest heretumor esetén csökkent, de az infertilis, oligozoospermiásénál jobbnak mutatkozott. Az onkológiai célból fagyasztva tárolásra kerülő ondóminta későbbi felhasználása asszisztált reprodukciós célokra nem hordoz emelkedett genetikai kockázatot, sem magasabb vetélési kockázatot jelentő emelkedett arányú mag kondenzációs defektust.

ÖSSZEFOGLALÁS

A reproduktív korú férfiak leggyakoribb szolid malignus megbetegedése a heretumor, melynek incidenciája az elmúlt évtizedekben jelentősen növekedett. A betegek túlélése a tumorelles kezelés fejlődésének köszönhetően jó. Ismert azonban a heretumor és az alkalmazott kezelések fertilitásra kifejtett negatív hatása is.

A spermogram mennyiségi mutatóinak romlásáról sok közlemény beszámolt. Ugyanakkor kevés adat áll rendelkezésre a spermiumok minőségi jellemzőiről. A jelen kutatás célja volt a heretumoros betegek spermogram eltérésének elemzése, a betegek fertilitásának utámkövetése és a spermiumok minőségi jellemzése, genetikai, epigenetikai és funkcionális szempontokból.

A vizsgálatunk 68 heretumoros és 51 lymphomás beteg spermogram értékeinek összehasonlításával kezdődött, mely során megállapítottuk, hogy a heretumoros betegek 13,2%-a a betegség diagnózisakor azoospermiás, az átlagos spermium koncentrációjuk pedig alacsonyabb, mint a lymphomás betegeké.

Kérdőíves felmérésünk ugyanakkor azt igazolta, hogy spontán terhesség a gyermeket kívánó párok 52%-nál jött létre, a fagyasztott spermium felhasználás pedig 11,9%-os volt.

Kísérleteinket 28 heretumoros beteg mintáin végeztük el, melyeket 20 infertilis, oligozoospermiás és 20 normozoospermiás férfi eredményeivel hasonlítottuk össze. A heretumorosoktól származó, tumorelles kezelés megkezdése előtti spermiumok nem hordoznak nagyobb becsült számbeli kromoszóma rendellenességet, illetve nem tartalmaznak több reziduális hiszton fehérjét az egészséges férfiakhoz képest. A fertilizációs képességükben elmaradnak az egészségestől, de eredményeik jobbakként, mint az infertilis betegeké.

A heretumoros betegeknek segítséget ad az eredményeink interpretálása a krioprezerváció illetve a fagyasztott minta felhasználásával kapcsolatos döntéshozatalban.

SUMMARY

Testicular germ cell carcinoma (TC) is the most frequent solid tumor in men aged 15-35 years. Its incidence has been doubled in the past decades. The use of chemo- and radiotherapy combined with surgery has resulted in good survival rates. However, the tumor itself and the anticancer treatment also can have negative effect on spermatogenesis.

An increasing number of reports suggest that spermatogenesis is altered in TC patients at the time of the diagnosis. However, the mechanism responsible for the decreased semen quantity in patients with testicular cancer patients is not well understood. Aims of our study were evaluating the semen parameters of patients with TC, follow-up to collect data on their posttreatment fertility and to investigate sperm genetic, epigenetic and functional changes caused by the cancer process.

We compared semen parameters of 68 TC patients to 51 men with lymphoma. In the TC group 13,2% of the patients were azoospermic at the diagnosis, furthermore mean sperm concentration was also the lowest in this group.

Our follow-up study found that the posttreatment spontaneous pregnancy rate is 52%, the time to pregnancy is 4,4 years in the studied group and the cryopreserved semen was utilized in 11,9% of the cases.

We evaluated semen samples of 28 TC patients, 20 infertile, oligozoospermic men and 20 sperm donors. The results did not reveal any significant difference in estimated numerical chromosome aberrations and AB staining results upon comparing the normozoospermic and testicular cancer groups, although the functional test results were lower in the TC group.

The correct interpretation of these results can help young cancer patients in decision making regarding cryopreservation and utilisation of cryostored semen samples.

IRODALOMJEGYZÉK

A disszertációban felhasznált irodalom jegyzéke

- {1} European Association of Urology Guideline, edition presented at the 25th EAU Annual Congress, Barcelona, 2010, ISBN 978-90-79754-70-0
- {2} Aitken RJ, Koopman P, Lewis SE. Seeds of concern. *Nature*, 2004; 432: 48-52
- {3} Shanmugalingam T, Soultati A, Chowdhury S, Rudman S, van Hemelrijck. Global incidence and outcome of testicular cancer. *Clin Epidemiol*, 2013, 5:417-427
- {4} Országos Onkológiai Intézet. Nemzeti Rákregiszter, www.ocol.hu/rakreg/stat3/index.html
- {5} United Kingdom Testicular Cancer Study Group. Aetiology of testicular cancer: association with congenital abnormalities, age at puberty, infertility, and exercise.. *BMJ*, 1994, 28;308(6941):1393
- {6} Batata MA, Chu FC, Hilaris BS, Whitmore WF, Golbey RB. Testicular cancer in cryptorchids. *Cancer*. 1982, 49:1023-30
- {7} Fossa SD, Chan J, Schonfeld SJ, McGlynn KA, McMaster ML, Gali MH, Travis LB. Risk of contralateral testicular cancer: a populationbased study of 29,515 US men. *J Natl Cancer Inst*. 2005, 97:1056-1066
- {8} Daugaard G, Rørth M, von der Maase H, Skakkebaek NE. Management of extragonadal germ-cell tumors and the significance of bilateral testicular biopsies. *Ann Oncol*. 1992, 3(4):283-9
- {9} Diekmann KP, Kulejewski M, Pichlmeier U, Loy V. Diagnosis of contralateral testicular intraepithelial neoplasia (TIN) in patients with testicular germ cell cancer: systematic two-site biopsies are more sensitive than a single random biopsy. *Eur Urol*. 2007, 51(1):175-183
- {10} Kratz CP, Phuong LM, Greene MH. Familial testicular germ cell tumors. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab*. 2010, 24(3):503-513

- {11} Rapley EA, Turnbull C, Al Olama AA, Dermitzakis ET, Linger R, Huddart RA, et al. A genome-wide association study of testicular germ cell tumor. *Nat Genet.* 2009, 41(7):807-10
- {12} Prener A, Engholm G, Jensen OM. Genital anomalies and risk for testicular cancer in Danish men. *Epidemiology.* 1996, 7(1):14-9
- {13} Meirow D, Schenker JG. Cancer and male infertility. *Hum Reprod* 1995, 10: 2017-22
- Meseguer M, Molina N, García-Velasco JA, Remohí J, Pellicer A, Garrido N. Sperm cryopreservation in oncological patients: a 14-year follow-up study. *Fertil Steril* 2006, 85: 640-5
- {14} Hallak J, Kolettis PN, Sekhon VS, Thomas AJ Jr, Agarwal A. Sperm cryopreservation in patients with testicular cancer. *Urology.* 1999, 54(5):894-9
- {15} Gandini L, Lombardo F, Salacone P, Paoli D, Anselmo AP, Culasso F, Dondero F, Lenzi A. Testicular cancer and Hodgkin's disease: evaluation of semen quality. *Hum Reprod.* 2003, 18(4):796-801
- {16} Trottmann M, Becker AJ, Stadler T, Straub J, Soljanik I, Schlenker B, Stief CG. Semen quality in men with malignant diseases before and after therapy and the role of cryopreservation. *Eur Urol.* 2007, 52(2):355-67
- {17} Møller H, Skakkebaek NE: Risk of testicular cancer in subfertile men: case-control study. *BMJ.* 1999, 318:559-62
- {18} Olesen IA, Hoei-Hansen CE, Skakkebaek NE, Petersen JH, Rajpert-De Meyts E, Jørgensen N: Testicular carcinoma in situ in subfertile Danish men. *Int J Androl.* 2007, 30: 406-411
- {19} Jacobsen R, Bostofte E, Engholm G, Hansen J, Olsen JH, Skakkebaek NE, et al.: Risk of testicular cancer in men with abnormal semen characteristics: cohort study. *BMJ.* 2000, 321: 789-792

- {20} Raman JD, Nobert CF, Goldstein M: Increased incidence of testicular cancer in men presenting with infertility and abnormal semen analysis. J Urol. 2005, 174:1819-1822
- {21} Skakkebaek NE, Rajpert-De Meyts E, Main KM. Testicular dysgenesis syndrome: an increasingly common developmental disorder with environmental aspects. Hum Reprod 2001, 16: 972-8
- {22} Dohle, G.R.: Male infertility in cancer patients: Review of the literature. Int. J. Urol., 2010, 17, 327-31
- {23} Eble JN, Sauter G, Epstein JI, Sesterhenn I. WHO Classification of Tumours. Pathology and Genetics. Tumours of the Urinary System and Male Genital Organs. Lyon, France: IARC Press; 2004
- {24} Gulácsi A, Glasz T, Takács T, Riesz P, Nyirády P, Kopa Zs. Fertilitási zavarok kivizsgálása során észlelt intratubularis germinális sejtes neoplasiák. Uroonkológia. 2013, 10;1:5-10
- {25} Papp Gy. Az andrológia tankönyve. Medicina Kiadó, Budapest, 2000
- {26} International Germ Cell Consensus Classification: a prognostic factor-based staging system for metastatic germ cell cancers. International Germ Cell Cancer Collaborative Group. J Clin Oncol. 1997, 15:594-603
- {27} Wallace, W.H., Anderson, R.A., Irvine, D.S.: Fertility preservation for young patients with cancer: who is at risk and what can be offered? Lancet Oncol., 2005, 6, 209–218
- {28} 4. számú melléklet a 30/1998. (VI. 24.) NM rendelethez
- {29} Lass, A., Akagbosu, F., Brinsden, P. Sperm banking and assisted reproduction treatment for couples following cancer treatment of the male partner. Hum. Reprod. Update, 2001, 7: 370–377

- {30} Martin R, Chernos J, Rademaker AW. The effect of cryopreservation on the frequency of chromosomal abnormalities and sex ratio in human sperm. *Mol Reprod Dev.* 1991, 30:159-163
- {31} Schover, L.R., Brey, K., Lichtin, A., et al.: Knowledge and experience regarding cancer, infertility, and sperm banking in younger male survivors. *J. Clin. Oncol.*, 2002, 20, 1880-9
- {32} van Casteren, N.J., van Santbrink, E.J., van Inzen, W., et al.: Use rate and assisted reproduction technologies outcome of cryopreserved semen from 629 cancer patients. *Fertil. Steril.*, 2008, 90, 2245–2250
- {33} Downie SE, Flaherty SP, Matthews CD. Detection of chromosomes and estimation of aneuploidy in human spermatozoa using fluorescent in-situ hybridization. *Mol Hum Reprod.* 1997; 3(7): 585-598
- {34} Aoki vW, Carrell DT. Human protamines and the developing spermatid. their structure, function, expression and relationship with male infertility. *Asian J Androl.* 2003, 5(4):315-324
- {35} Hofmann N, Hilscher B. Use of aniline blue to assess chromatin condensation in morphologically normal spermatozoa in normal and infertile men. *Hum Reprod.* 1991; 6(7):979-82
- {36} Foresta C, Zorzi M, Rossato m, Varotto A. Sperm nuclear instability and staining with aniline blue: abnormal persistence of histones in spermatozoa in infertile men. *Int J Androl.* 1992; 15:330–337
- {37} Agarwal A, Said TM. Role of sperm chromatin abnormalities and DNA damage in male infertility. *Hum Reprod Update.* 2003, 9(4):331-345
- {38} Sati L, Huszar G. Methodology of aniline blue staining of chromatin and the assessment of the associated nuclear and cytoplasmic attributes in human sperm. *Methods Mol Biol.* 2013, 927:425-36

- {39} Cho C, Jung-Ha H, Willis WD, Goulding EH, Stein P, Schultz RM, Hecht NB, Eddy EM. Protamine 2 deficiency leads to sperm DNA damage and embryo death in mice. *Biol Reprod*. 2003, 69(1):211-217
- {40} Huszar G, Ozenci CC, Cayli S, Zavaczki Z, Hansch E, Vigue L. Hyaluronic acid binding by human sperm indicates cellular maturity, viability, and unreacted acrosomal status. *Fertil Steril*. 2003, 79,3:1616-24
- {41} Jakab A, Sakkas D, Delpiano E, Cayli S, Kovanci E, Ward D, Revelli A, Huszar G. Intracytoplasmic sperm injection: a novel selection method for sperm with normal frequency of chromosomal aneuploidies. *Fertil Steril*. 2005, 84(6):1665-73
- {42} Huszar G, Jakab A, Sakkas D, Ozenci CC, Cayli S, Delpiano E, Ozkavukcu S. Fertility testing and ICSI sperm selection by hyaluronic acid binding: clinical and genetic aspects. *Reprod Biomed Online* 2007, 14:650-663
- {43} Cooper TG, Noonan E, von Eckardstein S, Auger J, Baker GHW, Behre HM, Haugen TB, Kruger T, Wang C, Mbizvo MT et al. World Health Organization reference values for human semen characteristics. *Hum Reprod Update*. 2010, 16(3):231–245
- {44} van der Steeg JW, Steures P, Eijkemans MJC, Habbema JDF, Hompes PGA, Kremer JAM, van der Leeuw-Harmsen L, Bossuyt PMM, Repping S, Silber SJ et al. Role of semen analysis in subfertile couples. *Fertil Steril*. 2011, 95(3):1013-1020
- {45} Mallidis C, Cooper TG, Hellenkemper B, Lablans M, Uckert F, Nieschlag E. Ten years' experience with an external quality control program for semen analysis. *Fertil Steril*. 2012, 98(3):611-621
- {46} World Health Organization. WHO Laboratory Manual for the Examination and Processing of Human Semen. Geneva. World Health Organization, 2010
- {47} Egozcue J, Blanco J, Vidal F. Chromosome studies in human sperm nuclei using fluorescence in-situ hybridization (FISH). *Hum Reprod Update*. 1997, 3(5):441-52

- {48} Jakab A, Kovacs T, Zavaczki Z, Borsos A, Bray-Ward P, Ward D, Huszar G. Efficacy of the swim-up method in eliminating sperm with diminished maturity and aneuploidy. *Hum Reprod.* 2003, 18(7):1481-8
- {49} Mokanszki A, Molnar Z, Ujfalusi A, Balogh E, Bazsane ZK, Varga A, Jakab A, Olah E. Correlation study between sperm concentration, hyaluronic acid-binding capacity and sperm aneuploidy in Hungarian patients. *Reprod Biomed Online.* 2012, 25(6):620-6
- {50} Martin RH, Rademaker A. Reliability of aneuploidy estimates in human sperm: results of fluorescence in situ hybridization studies using two different scoring criteria. *Mol Reprod Dev.* 1995, Sep;42(1):89-93
- {51} Sellami A, Chakroun N, Ben Zarrouk S, Sellami H, Kebaili S, Rebai T, Keskes L. Assessment of chromatin maturity in human spermatozoa: useful aniline blue assay for routine diagnosis of male infertility. *Adv Urol.* 2013, 578631
- {52} Chung, K., Irani, J., Knee, G., et al.: Sperm cryopreservation for male patients with cancer: an epidemiological analysis at the University of Pennsylvania. *Eur. J. Obstet. Gynecol. Reprod. Biol.* 2004, 5, 7-11
- {53} Agarwal, A., Allamaneni, S.S. Disruption of spermatogenesis by the cancer disease process. *J. Natl. Cancer. Inst. Monogr.* 2005, 34:9-12
- {54} Blackhall FH, Atkinson AD, Maaya MB, Ryder WD, Horne G, Brison DR, Lieberman BA, Radford JA. Semen cryopreservation, utilisation and reproductive outcome in men treated for Hodgkin's disease. *Br J Cancer* 2002; 87: 381-4
- {55} Meseguer, M., Molina, N., Garcia-Velasco, J.A., et al.: Sperm cryopreservation in oncological patients: a 14-year followup study. *Fertil. Steril.*, 2006, 85:640–645
- {56} Botchan A, Karpol S, Lehavi O, Paz G, Kleiman SE, Yogev L, Yavetz H, Hauser R. Preservation of sperm of cancer patients: extent of use and pregnancy outcome in a tertiary infertility center. *Asian J Androl.* 2013, 15(3):382-6

- {57} Crha I, Ventruba P, Zakova J, Huser M, Kubesova B, Hudecek R, Jarkovsky J. Survival and infertility treatment in male cancer patients after sperm banking. *Fertil Steril* 2009; 91: 2344-259
- {58} Huyghe, E., Matsuda, T., Daudin, M., Chevreau C, Bachaud JM, Plante P, Bujan L, Thonneau P. Fertility after testicular cancer treatments: results of a large multicenter study. *Cancer*, 2004, 15, 732-7
- {59} Carpentier MY, Fortenberry JD. Romantic and sexual relationships, body image, and fertility in adolescent and young adult testicular cancer survivors: a review of the literature. *J Adolesc Health* 2010; 47: 115-25
- {60} Központi Statisztikai Hivatal. MAGYARORSZÁ. 2012. 2013, Available from: www.ksh.hu
- {61} Kapitány B, Spéder Zs. Gyermekvállalás. *Demográfiai Portré*, KSH Népeségtudományi Kutató Intézet, Budapest, 2009, 29-40
- {62} Ovári L, Sati L, Stronk J, Borsos A, Ward DC, Huszar G. Double probing individual human spermatozoa: aniline blue staining for persistent histones and fluorescence in situ hybridization for aneuploidies. *Fertil Steril*. 2010; 1;93(7):2255-2261
- {63} Pylyp LY, Spinenko LO, Verhoglyad NV, Zukin VD. Chromosomal abnormalities in patients with oligozoospermia and non-obstructive azoospermia. *J Assist Reprod Genet*. 2013; 30(5):729-32
- {64} Berthelsen JG, Skakkebaek NE. Gonadal function in men with testis cancer. *Fertil Steril*. 1983,39(1):68-75
- {65} van Casteren, NJ, Boellaard, WP, Romijn, JC, et al.: Gonadal dysfunction in male cancer patients before cytotoxic treatment. *Int. J. Androl.*, 2010, 33, 73-9
- {66} Rives N, Perdrix A, Hennebicq S, Saïas-Magnan J, Melin MC, Berthaut I, Barthélémy C, Daudin M, Szerman E, Bresson JL et al. The semen quality of 1158 men with testicular

cancer at the time of cryopreservation: results of the French National CECOS Network. *J Androl.* 2012, 33(6):1394-401

{67} Tempest HG, Ko E, Chan P, Robaire B, Rademaker A, Martin RH. Sperm aneuploidy frequencies analysed before and after chemotherapy in testicular cancer and Hodgkin's lymphoma patients. *Hum Reprod.* 2008, 23(2):251-8

{68} McDowell S, Harrison K, Kroon B, Ford E, Yazdani A. Sperm DNA fragmentation in men with malignancy. *Fertil Steril.* 2013, 99(7):1862-6

{69} Ståhl O, Eberhard J, Jepson K, Spano M, Cwikiel M, Cavallin-Ståhl E, Giwercman A. Sperm DNA integrity in testicular cancer patients. *Hum Reprod.* 2006, 21(12):3199–3205

{70} Yagci A, Murk W, Stronk J, Huszar G. Spermatozoa bound to solid state hyaluronic acid show chromatin structure with high DNA chain integrity: an acridine orange fluorescence study. *J Androl.* 2010, 31(6):566-72

{71} Ruixue W, Hongli Z, Zhihong Z, Rulin D, Dongfeng G, Ruizhi L. The impact of semen quality, occupational exposure to environmental factors and lifestyle on recurrent pregnancy loss. *J Assist Reprod Genet.* 2013; 30(11):1513-8

{72} Auger J, Mesbah M, Huber C, Dadoune JP. Aniline blue staining as a marker of sperm chromatin defects associated with different semen characteristics discriminates between proven fertile and suspected infertile men. *Int J Androl.* 1990, 13:452–462

{73} Worrilow KC, Eid S, Woodhouse D, Perloe M, Smith S, Witmyer J, Ivani K, Khoury C, Ball GD, Elliot T, Lieberman J. Use of hyaluronan in the selection of sperm for intracytoplasmic sperm injection (ICSI): significant improvement in clinical outcomes--multicenter, double-blinded and randomized controlled trial. *Hum Reprod.* 2013 28(2):306-14



DEBRECENI EGYETEM
EGYETEMI ÉS NEMZETI KÖNYVTÁR
PUBLIKÁCIÓK



Iktatószám: DEENKÉTK/177/2014.
Tételszám:
Tárgy: Ph.D. Publikációs Lista

Jelölt: Molnár Zsuzsanna
Neptun kód: F68SOC
Doktori Iskola: Klinikai Orvostudományok Doktori Iskola
MTMT azonosító: 10044155

A PhD értekezés alapjául szolgáló közlemények

1. **Molnár, Z.**, Berta, E., Benyó, M., Póka, R., Kassai, Z., Flaskó, T., Jakab, A., Bodor, M.: Fertility of testicular cancer patients after anticancer treatment: Experience of 11 years.
Pharmazie. 69, 437-441, 2014.
IF:0.962 (2012)
2. **Molnár, Z.**, Mokánszki, A., Kassai, Z., Bhattoa, H.P., Benyó, M., Oláh, É., Jakab, A.: Sperm concentration, hyaluronic acid binding capacity, aneuploidy and persistent histones in testicular cancer.
Hum. Reprod. "accepted by publisher" (2014)
IF:4.67 (2012)





További Közlemények

3. **Molnár Z.**, Benyó M., Bazsáné Kassai Z., Lévai Á., Varga A., Jakab A.: Reprodukív korban előforduló daganatok hatása a spermiogenezisre: heredaganatos és lymphomás betegek vizsgálata.
Orv. Hetil. 155 (33), 1306-1311, 2014.
4. Benyó, M., Hársfalvi, J., Pfliegler, G., **Molnár, Z.**, Murányi, M., Józsa, T., Flaskó, T.: Present practice of thrombosis prophylaxis of radical prostatectomy in a European country - a Hungarian multicenter study.
Urol. Int. 92 (3), 289-293, 2014.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1159/000353918>
IF:1.065 (2012)
5. Mokánszki A., Ujfalusi A., Balogh E., **Molnár Z.**, Jakab A., Varga A., Oláh É.: A spermiumkoncentráció, a hialuronsav-kötődési képesség és a spermium aneuploidia összefüggéseinek vizsgálata.
Magyar Androl. 18 (2), 35-40, 2013.
6. Benyó, M., Flaskó, T., **Molnár, Z.**, Kerényi, A., Batta, Z., Józsa, T., Hársfalvi, J.: Follow-Up of Thrombin Generation after Prostate Cancer Surgery: Global Test for Increased Hypercoagulability.
PLoS One. 7 (12), e51299, 2012.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0051299>
IF:3.73
7. 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), 52-61, 2012.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1556/OH.2013.29510>
8. Mokánszki, A., Ujfalusi, A., Balogh, E., Sümegi, A., Antal-Szalmas, 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:1.847



DEBRECENI EGYETEM
EGYETEMI ÉS NEMZETI KÖNYVTÁR
PUBLIKÁCIÓK



9. 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:2.675
10. Jakab A., **Molnár Z.**, Tóth Z.: A polycystás ovarium szindróma etiopatogenezise és a polycystás ovarium képalkotó diagnosztikája.
Magyar Radiol. 79 (4), 170-177, 2005.

A közlő folyóiratok összesített impakt faktora: 14.949

A közlő folyóiratok összesített impakt faktora (az értekezés alapjául szolgáló közleményekre): 5.632

A DEENK a Jelölt által az iDEa Tudóstérbe feltöltött adatok bibliográfiai és tudományometriai ellenőrzését a tudományos adatbázisok és a Journal Citation Reports Impact Factor lista alapján elvégezte.

Debrecen, 2014.07.22.



Dr. Molnár Zsuzsanna a disszertáció témájához kapcsolódó előadásainak listája

1. **Molnár Zs.**, Bazsáné Kassai Zs., Balázs M., Jakab A. Aneuploid spermiumok előfordulása, kimutatása és reprodukciós jelentősége” Magyar Urológiai Társaság Andrológiai Szekció 28. Tudományos Ülése, 2004. szeptember 23-25, Szeged
2. **Molnár Zs.**, Rákossy Zs., Treszl A., Balász M., Bazsáné Kassai Zs., Kovács T., Jakab A. Spermiumon végzett FISH vizsgálattal szerzett tapasztalataink” Magyar Asszisztált Reprodukciós Társaság V. Nemzeti Kongresszusa, 2005. április 22-23, Visegrád
3. **Molnár Zs.**, Bazsáné Kassai Zs., Jakab A. Ivarsejt adományozás a hazai gyakorlatban” Fiatal Nőorvos Társaság Kongresszusa, 2005. október 28-29, Szeged
4. Jakab A, Kovács T, Békési Gy, **Molnár Zs**, Sevil C, Huszár G. A diploid spermium. A Magyar Urológusok Társasága Andrológiai Szekció 30. Tudományos Ülése, 2006. március 30 – április 1, Debrecen.
5. **Molnár Zs**, Bazsáné Kassai Zs, Jakab A, Szűcs M, Benyó M, Bógyi Gy. Kemoterápián átesett férfiak fertilitási problémái. A Magyar Andrológiai Tudományos. Társaság I. Kongresszusa, 2007, Siófok.
6. **Molnár Zs.**, Jakab A., Reproductív Andrológia: Környezeti ártalmak és a spermium” A XVI. Primer Prevenció Fórum, 2008. május 21., Budapest
7. **Molnár Zs**, Bazsáné Kassai Zs, Szűcs M, Benyó M, Jakab A. A fertilitási prognózist befolyásoló kezdeti tényezők vizsgálata onkológiai javallatú spermium fagyasztás esetén. A Magyar Andrológiai Tudományos. Társaság II. Kongresszusa, 2008, Sopron.
8. **Molnár Zs**, Jakab A, Bazsáné Kassai Zs, Benyó M, Tóth Z. Evaluation of semen quality in men with malignant diseases before therapy. 2008. március 6-9. Lisboa, Portugal, EBCOG 2008 – 20th European Congress of Obstetrics and Gynecology

9. **Molnár Zs**, Bazsáné Kassai Zs, Lévai I, Benyó M, Jakab A. A heretumoros betegek fertilitási prognózisa – retrospektív adatfeldolgozás. A Magyar Andrológiai Tudományos Társaság III. Kongresszusa, 2009, Galyatető.
10. **Molnár Zs**. Kromoszóma aneuploidia meghatározása humán spermiumban kemoterápia előtt és után „PhD szimpózium, DE Doktori Iskola, Klinikai Orvostudományok, 2009, május, Debrecen
11. Mokánszki A, Balogh e, Újfalusi A, Sümegi A, Varga A, Jakab A, **Molnár Zs**, Sápy T, Oláh É. A spermium FISH jelentősége infertilitásban. Magyar Humángenetikai Társaság VIII. Kongresszusa. 2010. szeptember 3, Debrecen.
12. Mokánszki A, **Molnár Zs**, Bazsáné Kassai Zs, Balogh E, Ujfalusi A, Sümegi A, Jakab A, Oláh É: A heredaganatos férfiak spermaképének, fertilizációs képességének és spermium kromoszóma anomáliáinak változása tumorelles kezelés előtt.. A Magyar Andrológiai Tudományos Társaság IV. Kongresszusa. 2010. November 4-6, Bika.
13. Jakab A, **Molnár Zs**, Benyó M, Lévai Í, Kassai Z. Semen quality at cryobanking before oncologic treatment. 2010. jún. 27-30. Rome, Italy. ESHRE 2010 – 19th Annual Meeting of the European Society of Human Reproduction and Embryology
14. **Molnár Zs**, Bazsáné Kassai Zs, Mokánszki A, Benyó M, Jakab A. Fertilitási prognosis és spermium vizsgálatok heredaganatos férfiaknál. “Aktualitások a reprodukív orvostudományban” Tudományos Ülés, 2011.09.13, Debrecen.
15. **Molnár Zs.**, Bazsáné Kassai Zs., Jakab A., Spermium funkcionális és genetikai vizsgálata csökkent fertilizáció esetén-munkacsoportunk, eredményeink bemutatása. Az MTA Debreceni Területi Bizottság I. sz. Orvosi és Biológiai Szakbizottság „Klinikai genetikai és ritka betegségek” munkacsoportjának tudományos ülése DAB Székház, Debrecen, 2011.11.22

16. **Molnár Zs**, Mokánszki A, Benyó M, Kassai Z, Oláh E, Jakab A. Sperm fertilization potential and chromosomal anomalies in testicular cancer before chemotherapy. 2011. július 3-6, Stockholm, Sweden - ESHRE 2011 – 20th Annual Meeting of the European Society of Human Reproduction and Embryology
17. **Molnár Zs**, Bazsáné Kassai Zs, Mokánszki A, Benyó M, Jakab A. Fertilitási prognózis és spermium vizsgálatok heredaganatos férfiaknál – utánkövetésünk eredményei. Andrológus –Embriológus találkozó, 2012.03.09, Budapest
18. Mokánszki A., Ujfalusi A., Balogh E., **Molnár Zs.**,Bazsáné KZ., SápyT.,Jakab A., Varga A., Oláh É. Genetikai vizsgálatok férfi infertilitásban. Magyar Andrológiai Tudományos Társaság (MATT) VI. Kongresszusa, Eger, 2012, november 8-10
19. Jakab A, Mokánszki A, Varga A, Benyó M, Bazsáné Kassai Z, Oláh E, **Molnár Zs**. Sperm fertilization potential and chromosomal anomalies at decreased sperm concentration: differences between testicular cancer patients and infertile men. 20th ESHRE London, UK, 2013. 07.7-10

TÁRGYSZAVAK

heretumor, fertilitás megőrzése, férfi infertilitás, kemoterápia, sugárkezelés, spermium fluorescens in situ hibridizáció, spermium anilin kék festés, reziduális hiszton kimutatás, spermium hialuronsav kötődési vizsgálata,

KEYWORDS

testicular cancer, fertility preservation, male infertility, chemotherapy, irradiation, sperm fluorescent in situ hybridisation, sperm anilin-blue staining, residual histone detection, sperm hialuronian acid binding assay

KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Köszönettel tartozom témavezetőmnek, **Dr. Jakab Attila** tanár úrnak, aki hazahozta a Yale egyetemről az andrológiai kutatás elméleti és gyakorlati ismereteit és a spermium fiziológiával való foglalkozás szeretetét. Már orvostanhallgató koromban bizalommal fordult felém, segítette szakmai céljaim elérését és megadta a lehetőséget, hogy témavezetésével elkészüljön ez a Ph.D. értekezés.

Köszönettel tartozom **Dr. Bazsáné Dr. Kassai Zsuzsa** laboratórium vezetőnek. Szerencsés vagyok, hogy tőle sajátíthattam el a laboratóriumi és az andrológiai laboratóriumi munka alapjait. Köszönöm, hogy szárnyai alá vett, és oly sok útmutatással látott el kutatásaim során. Hálásan köszönöm neki emberi és szakmai segítségét.

Köszönettel tartozom **Dr. Tóth Zoltán professzor úrnak**, aki biztatott a Ph.D. dolgozat megírására és biztosította a tudományos munka klinikai és technikai hátterét.

Különös hálával tartozom **Dr. Mokánszki Attilának** az együtt végzett munkáért, és a sok-sok szakmai segítségért.

Nem megszokott módon szeretném megköszönni a kutatásaimban résztvevő heretumoros **betegek** felém tanúsított bizalmát, vizsgálatokon való lelkes részvételét és érdeklődésüket az eredményeink iránt.

Szeretném megköszönni **szüleimnek és testvéremnek** a szeretetteljes támogatást, és hogy a kezdetektől fogva önzetlenül bíztattak tanulmányaim során.

Végül, de nem utolsó sorban, hálás vagyok **férjemnek és gyerekeimnek**, akik elviselték mikor helyettük a kutatásommal, betegeimmel, dolgozatom írásával voltam elfoglalva, lelkesen támogattak, és lehetővé tették számomra azt, hogy eljuthassak idáig.

FÜGGELÉK