

A házaspárok 10-15%-a akaratauk ellenére gyermektelen, és ez a tény nem csak az egyén, de a populáció szempontjából sem elhanyagolható, hiszen a fejlettebb országok nagy részében - ilyen szempontból mi is ide tartozunk - a halálozások száma meghaladja a szüléseket. Ez nemcsak a népesség számának csökkenéséhez, de annak kedvezőtlen koreloszlásához is vezet. Megoldása az Európai Unió szintjén is támogatott kutatási terület.

A meddőség kezelésének hatékonysága forradalmi javulást mutatott az elmúlt évtizedben, aminek következtében egyes országokban már most is eléri az összes újszülött között az asszisztált reprodukciós eljárások segítségével született gyermekek aránya az 1%-ot. Tekintettel arra, hogy ezek a beavatkozások a jövőben várhatóan még szélesebb körben elterjednek, egyre fontosabbá válnak a felmerülő etikai és szakmai problémák.

Mivel becslések szerint a meddőség 30%-ban genetikai eredetű, az egyik legfontosabb kérdés, hogy az örökletes tényezők mennyiben befolyásolják az utód egészségét valamint, hogy milyen mértékben kell számítani a populációgenetikai változásokra. A genetikai rendellenességek többsége az utód létrehozásának képtelenségével jár. A letális rendellenességek esetén a beteg nem éli meg a reprodukzív kort. Az ilyen érintett magzat már méhen belül elhal (spontán vetélés vagy halvaszülés), elveszülés esetén újszülöttkori vagy koragyermekkori halál következik be. Másik csoportba azok a betegek sorolhatók, akiknél különböző súlyos szomatikus rendellenességek fordulnak elő. Az értelmi fogyatékoság és a meddőség is gyakran együtt jár ezekkel a kórképekkel. Az infertilitási klinikákat elsősorban olyan betegek keresik fel, akik általános egészségi állapota nem vagy csak viszonylag csekély mértékben szenvedett sérülést, azonban gyakran gén- vagy kromoszómaszintű károsodás miatt csökkent a termékenyítőképességük.

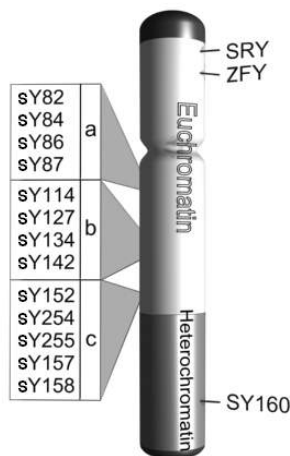
Az infertilitás kialakulásában számos genetikai tényező játszhat szerepet, ezek közül a leggyakrabban előforduló Y-kromoszóma mikrodeléciókat, valamint a citogenetikai rendellenességeket vizsgálatuk tanulmányunkban.

### **Y-kromoszóma mikrodeléciók**

A meddőséget vagy csökkent termékenyítőképességet előidéző mutációk közül legnagyobb jelentőségűek az Y kromoszóma *AZF régiójához tartozó mikrodeléciók*. Az AZF rövidítés az azoospermia faktorból adódik. Jóval több mint 100 mikrodeléciót mutattak ki a meddő férfiak 7-30%-ánál. Az autoszómák közöttihez hasonló rekombinációk az Y kromoszóma legnagyobb részén (male specific region-Y – MSY) homológ kromoszóma hiányában nem alakulhat ki. Ennek következtében a mikrodeléciók az Y kromoszómán jelen

lévő homológ szekvenciák közötti intrakromoszómális rekombináció révén jöhetnek létre. Az AZF régióban található gének a spermatogenezist irányítják, mutációik különböző szinten gátolhatják a spermatogenezist. A mutációk pontos hatása még nem ismert. A legsúlyosabb esetben csak Sertoli sejtek találhatók a testisben, más betegeknél a spermatogenetikus alakok különböző formáival találkozunk, aminek megfelelően az ejakulátumban is eltérő lehet a citológiai kép.

A vizsgált primerek ill. STS-k (sequence tagged sites) helyes megválasztása több szempontból is fontos: egyrészt az Y kromoszómán számos polimorfizmus található (amelyek az evolúció, az etnikumok vagy az apasági vizsgálatok számára igen hasznos információkkal szolgálnak) azonban a fertilitás szempontjából nincs klinikai jelentőségük, így a nem megfelelő STS-k kiértékelése téves eredményhez vezethet. A laboratóriumi módszerek megbízhatóságának ellenőrzése szempontjából fontos a belső és külső kontroll primerek alkalmazása is. A fentiek miatt a primerek kiválasztásában az Európai Andrológiai Akadémia protokollját vettük alapul. Ez a megbízhatóság növelésén túl lehetővé tette azt is, hogy az eredményeinket más EU laboratóriumokéval összevessük.



### Eredmények:

- Hazánkban elsőként vezettük be az AZF (Y kromoszóma mikrodéléción) analízisét
- 121 ép karitotípusú oligospermiás (<5 millió/ml) vagy azoospermiás férfit vizsgáltunk infertilitás miatt. A 121 beteg közül 44 volt azoospermiás. 6 betegnél állapítottunk meg Y-mikrodéléciót (I. táblázat), mindegyik azoospermiás volt.

Az Y-mikrodéléción előfordulása tehát az infertilis betegek között **4,9%**, míg az azoospermiások között **13,6%** volt.

- Az Y polimorfizmusok alapján jelentős etnikai és földrajzi különbségek tapasztalhatók, ezzel szemben a klinikai jelentőséggel bíró AZF mutációk előfordulása hasonló: így a saját anyagunkban is az európai rátához hasonló előfordulást állapítottunk meg.
- Az eredményekből következik, hogy csak azoospermia vagy kriptozoospermia esetén érdemes Y-mikrodeléció vizsgálatokat végezni.
- A mikrodeléciók nem járnak együtt jellemző hormonális elváltozásokkal. Magas és alacsony FSH is előfordult a pozitív csoportban. A mikrodeléciókkal kapcsolatban a spermaleletet ill. a here szövettani képét kivéve szoros genotípus/fenotípus összefüggést nem sikerült kimutatni.
- Ezek a mutációk egyedül a spermatogenezis ill. a testis szövettani képét befolyásolják. Az AZFa és b régiók delécióira a Sertoli Cell only syndroma (SCOS) a jellemző. Az AZFc régió mutációi változatosabb kimenetelű következményekkel járnak, amelyeket a genetikai háttér és a környezeti tényezők is befolyásolhatnak.
- A fentiekből következik, hogy AZFa és b esetén főleg további vizsgálatokat és kezeléseket végezni, a ma ismert asszisztált reprodukciós technikák (ART) eljárások nem járnak eredménnyel. Ezzel szemben az AZFc mutációk esetén van esély arra, hogy ezek a beavatkozások sikerrel járnak. Itt „csak” az etikai problémák maradnak, mivel a fiú gyermek a beavatkozás következtében biztosan öröklő a beavatkozás révén az infertilitást okozó mutációt.
- Beigazolódt, hogy az Y kromoszóma mikrodeléció analízise a mikroszkópos szinten is észlelhető szerkezeti rendellenességek esetén is fontos kiegészítő információkkal szolgál (II. táblázat). Az Y kromoszóma szerkezeti rendellenessége esetén a 2-es és a 3-as betegnél (3-as még gyermek) a b és a c régió együttes hiányát állapítottuk meg, ami a 2-es betegnél az SCOS kialakulását magyarázza, és a 3-as betegnél pedig nagy valószínűséggel ugyanez várható. A 1-es betegnél is SCOS-t állapítottunk meg ami feltehetően a teljes c régió hiányának az eredménye. Ezek az információk korábban csak a citogenetikai vizsgálatokkal nem voltak elérhetőek.
- A genetikai módszerek fejlődésével igazolódt, hogy a primer amenorrhéa nőknél a korábban véltől nagyobb arányban fordul elő az Y kromoszóma vagy annak csak egy része. A pontos diagnózis többek között a gonadoblastoma fokozott kockázata miatt fontos. Az 1. betegnél (III. táblázat) a szokásos citogenetikai módszerekkel is igazolódt az Y jelenléte, a molekuláris genetikai vizsgálattal a kromoszóma

intaktságát lehetett bizonyítani. Mivel az SRY-gén is jelen volt, feltehető, hogy nem ennek a génnek a mutációja okozta a női fenotípust. A Turner fenotípusú betegeknél is egyre gyakrabban lehet az Y kromoszóma jelenlétét igazolni (2-es beteg).

- A perifériás vérből történő konvencionális citogenetikai módszerek valamint az AZF vizsgálatok mellett hasznos kiegészítő információval szolgál a limfociták és/vagy a szájnyálkahártya sejtek FISH vizsgálata is a szerkezeti kromoszóma-rendellenességet hordozó betegek esetében. A fent említett betegnél (II.táblázat 3-as eset) kiegészítő vizsgálatként interfázis-FISH-t (iFISH) is végeztünk, amelynek segítségével megállapítottuk, hogy két különböző szövetben is (szájnyálkahártya valamint limfocita sejtekben) X monoszómiás ill. Y töredéket hordozó sejtvonalt is található mozaikos formában. Két másik betegnél (III.táblázat 2-es és 5-ös beteg) ugyancsak elvégeztük kiegészítő vizsgálatként a FISH-t, ami megerősítette az Y kromoszóma töredék mozaikos jelenlétét limfocitából és szájnyálkahártya sejtekből. Az 5-ös eset érdekessége, hogy limfocitából mind konvencionális, mind FISH vizsgálattal 100%-ban X monoszómiás sejtvonalt állapítottunk meg, azonban a beteg fenotípusa nem volt egyértelműen Turner szindrómára jellemző. A vizsgálatot ezért egészítettük ki szájnyálkahártya iFISH-sel is, ami 18%-ban igazolta az Y centromerikus régió meglétét, és magyarázatul szolgált a beteg fenotípusára. További 2 esetben (III.táblázat 6-os és 7-es beteg) diagnosztizáltunk Turner fenotípus mellett mozaik sejtvonalt szájnyálkahártyából végzett iFISH-sel. Egy 6 hónapos kisbabánál (III.táblázat 8-as eset) vérkenetből valamint szájnyálkahártyából végeztük el az iFISH analízist, miután prenatálisan, amniocentézissel 45,X/46,XX kariotípust állapítottunk meg. A vérkenet és a szájnyálkahártya vizsgálat megerősítette a magzatvízsejtekben talált eredményt. A fenti eredmény alapján felmerül, hogy a Turner szindrómás betegek rutin genetikai kivizsgálásának részévé kellene tenni különböző szövetekből az SRY gén ill. az Y-kromoszóma centromerikus részére specifikus DNS próbával az interfázis-FISH elvégzését is. Ezekkel a módszerekkel akár a mozaik formában is jelen lévő Y-kromoszóma maradványainak a kimutatása megbízhatóbbá válna.
- A 46,XX kariotípusú férfiak esetében is hasznos kiegészítő információt adnak mind a molekuláris genetikai, mind a FISH vizsgálatok. Mind a három 46,XX-es betegünkönél igazoltuk az SRY jelenlétét (IV. táblázat). Az SRY gén FISH-el végzett kimutatásával nem csak a gén jelenlétét lehet igazolni, hanem a metafázisban annak helyét is meg lehet állapítani. A 2-es és a 3-as betegnél volt mód az SRY FISH-el történő

vizsgálatára, amellyel igazolódott, hogy a testis differenciálódásában kulcs szerepet játszó SRY-gén az X kromoszóma rövid kar telomerikus részére transzlokálódott.

## **A spermiumok FISH-sel történő analízise**

Az ivarsejtek genetikai vizsgálatai rendkívül hasznos információkkal szolgálnak a különböző genetikai rendellenességek előfordulásáról a meiózis illetve a meiózis utáni fázisokban. Először az aranyhórcsög pete penetrációs teszttel, majd a molekuláris citogenetikai módszerek (fluoreszcens in situ hibridizáció - FISH) felhasználásával vizsgálták a spermiumokat. A módszer lényege, hogy az analizálni kívánt kromoszómákat adott DNS szekvenciával komplementer DNS próbával jelölik. A DNS próbához különböző színű fluorokrómot kötnek, ami szignálként jelenik meg a fluoreszcens mikroszkópban. A rendkívül érzékeny és specifikus módszer lehetővé tette, hogy a hórcsögpete tesztnél jóval egyszerűbb módon nagyságrenddel nagyobb számú spermiumot analizáljunk. Hátránya viszont, hogy csak azokról a kromoszómákról kapunk információt, amelyekre specifikus DNS próbát alkalmazunk.

Normospermiás férfiak spermiumaiban 6,3% az összes kromoszóma-anomália átlagos előfordulása. A kromoszóma-anomáliák és a kóros spermiumok között eddig nem sikerült közvetlen összefüggést találni, így csak a spermium morfológiája alapján nem kapunk információt a genetikai károsodásokra vonatkozóan. Ezen kezdeti eredmények pontosítása azért fontos, mert az ICSI eljárásoknál csupán a morfológiai alapon történik a spermiumok kiválasztása.

### **Eredményeink:**

- Hazai viszonylatban elsőként vezettük be a spermiumok citogenetikai (FISH) analízisét.

#### **1. Spermiumok aneuploidia analízise 46,XY kariotípusú normozoospermiás kontroll csoport esetében**

Elsőként egy normozoospermiás, kontroll csoportban állapítottuk meg a spermiumok aneuploidia és diploidia előfordulási gyakoriságát.

Tanulmányunk során 8 *egészséges, normozoospermiás, ép kariotípusú férfi* spermiumainak genetikai analízisét végeztük el FISH-el a 13, 18, 21, X és Y kromoszómákra specifikus

próbákkal. Összesen 32621 spermiumot értékeltünk. A kontroll csoport diszómia és diploidia értékeit a 18, X és Y kromoszómákra nézve a V. táblázat, a 13. és 21. kromoszómákra nézve a VI. táblázat szemlélteti.

A 18. kromoszóma diszómia frekvenciái 0-0,2% között, a 13. kromoszómáé 0-0,25% között, a 21. kromoszómáé 0,06-0,5% közötti értékeket mutattak. Az ivari kromoszómákat tekintve az XX diszómia 0-0,18% között, az YY diszómia 0-0,1% között, az XY diszómia pedig 0-0,2% között volt.

A 18, X, Y kromoszómákat vizsgálva a diploidia 0,05-0,5% közötti arányban fordult elő, a 13, 21 kromoszómákat vizsgálva pedig 0-0,25% között.

## **2. Spermiumok aneuploidia vizsgálata 46,XY kariotípusú meddő férfiak esetében**

Kutatásaink során 77 infertilis férfi spermiumainak FISH analízisét végeztük el. 68 beteg esetében a 18, X és Y kromoszómák aneuploidiáját és diploidiáját tanulmányoztuk, 9 beteg esetében pedig a 13. és 21. kromoszómákét. Az infertilis csoport csak olyan betegekből állt, akiknél ép, 46,XY kariotípust diagnosztizáltunk. A 77 esetből háromnál az extrém alacsony spermium-koncentráció a FISH vizsgálat elvégzését nem tette lehetővé. 5 betegünkönél egy-egy kétoldali varicocele-t diagnosztizáltunk, 25 betegünkönél legalább három sikertelen ICSI beavatkozást végeztek, 2 betegünk felesége pedig habituális vetelő volt.

Az infertilis csoport 43,7%-nál oligo-astheno-teratozoospermiát (OATS-t), 31%-nál astheno-teratozoospermiát (ATS-t), 11,2%-nál oligo-asthenozoospermiát (OAS-t), 5,7%-nál oligo-teratozoospermiát (OTS-t), 4,2%-nál teratozoospermiát (TS-t), ugyancsak 4,2%-nál asthenozoospermiát (AS-t) diagnosztizáltunk. A betegek 48%-nál 10 millió/ml alatt, 14%-nál 10 és 20 millió/ml között, 38%-nál pedig 20 millió felett találtuk a spermium-koncentrációt. Az ép morfológiájú ivarsejtek átlaga 14%, a motilis spermiumoké pedig 19,1% volt.

Munkánk során összesen 103425 spermium genetikai analízisét végeztük el. Az infertilis férfiak diszómia és diploidia értékeit a 18, X és Y kromoszómákra nézve a VII. táblázat, a 13. és 21. kromoszómákra nézve pedig a VIII. táblázat foglalja össze. A 18. kromoszóma diszómia értékei 0-0,9% között, a 13. kromoszómáé 0,15-0,8% között, a 21. kromoszómáé 0,15-1,3% között változtak. Az ivari kromoszómákat tekintve az XX valamint az YY diszómia 0-0,8% között, az XY diszómia pedig 0-1,9% között volt. A 18, X, Y kromoszómákat vizsgálva a diploidia 0-1,12% között változott, míg a 13, 21 kromoszómákat vizsgálva 0-0,7% közötti értékeknek bizonyult.

A meddő férfiakat ejakulátum adataik alapján a következő kategóriákba soroltuk: 1. normál spermium-koncentráció mellett kóros motilitás és morfológia (ATS), 2. normál

morfológia mellett a spermium-koncentráció és/vagy motilitás volt a normálistól eltérő (OAS, AS), 3. normál motilitás mellett a spermium-koncentrációt és/vagy a morfológiát találtuk kórosnak (OTS, TS). Az infertilis férfiak csoportján belül a negyedik kategória az volt, ahol a spermium-koncentráció, morfológia és motilitás egyaránt eltért a WHO által meghatározott normál értékektől (OATS). Vizsgáltuk továbbá a 6 millió/ml alatti spermium-koncentrációval rendelkező férfiakat és azokat a betegeket, akik ejakulátumában a mobilis hímivarsejtek aránya nem érte el a 6%-ot. A hat kategóriát a IX. táblázat mutatja be.

- *Az eredmények összehasonlítása a meddő és a kontroll csoport között*

Összehasonlítva a kontroll és az infertilis csoport aneuploidia és diploidia értékeit megállapítottuk, hogy a 18. kromoszóma diszómia átlaga a meddő csoportban (0,3%), szignifikánsabban magasabb volt ( $p=0,06$ ), mint a kontroll donoroknál (0,09%). A 13. kromoszóma diszómia átlaga 0,4% valamint 0,15%-nak, a 21. kromoszóma diszómia átlaga pedig 0,65% illetve 0,2%-nak bizonyult az infertilis és a normozoospermiás csoportokban. A diszómia értékek mindkét kromoszómát tekintve szignifikánsan magasabbak voltak az infertilis csoportban ( $p<0,019$ ). Az ivari kromoszómák diszómia átlagai XX 0,23% valamint 0,067%, YY 0,33% valamint 0,05%, XY 0,2% és 0,06%-nak bizonyult a meddő és a kontroll csoportokban. Az XX valamint az YY diszómia szignifikánsan magasabb volt az infertilis csoportban ( $p<0,045$ ), azonban nem találtunk szignifikáns statisztikai különbséget az XY diszómiák között ( $p=0,13$ ).

A diploidia átlagok 0,3% és 0,14% voltak a 18, X, és Y kromoszómákat tekintve és 0,4% és 0,125% a 13 és 21-es kromoszómákra vizsgálva a meddő és a kontroll csoportban. Mindkét esetben szignifikánsan magasabbnak találtuk a diploidiát az infertilis csoportban ( $p<0,063$ ).

A szignifikancia-vizsgálatot két mintás, heteroscedasztikus student-féle t-próbával végeztük el.

- Összefoglalva megállapítható, hogy az infertilis férfiak aneuploidia és diploidia értékei (az XY diszómia kivételével) szignifikánsan magasabbnak bizonyultak mint a kontroll csoportban, valamint nincs szignifikáns összefüggés az aneuploidiák előfordulása valamint a motilitás, morfológia és a spermium-koncentráció között.

### **3. Spermiumok intraindividuális FISH vizsgálata infertilis férfiak esetében**

A sperma asszisztált reprodukciós eljárások előtti kezelésének hatásait a spermiumok kromoszóma-készletére donorminták híján nem állt módunkban vizsgálni. Helyette azonban 3 infertilis betegünk spermiumainak intraindividuális FISH analízisét végeztük el. A két minta leadása között átlagosan két hónap telt el. A 18, X és Y kromoszómákra nézve kóros ivarsejtek átlaga az első betegnél 1,5 ill. 1,8%, a második betegnél 2,1 ill. 1,7%, a harmadik betegnél 0,6%-nak bizonyult mindkét vizsgálatnál. *Eredményeink alapján megállapítható, hogy egyik betegnél sem található szignifikáns eltérés a két minta diszómia átlagai között*, amely egyrészt a módszer megbízhatóságát mutatja, másrészt igazolja, hogy a vizsgált kromoszómák aneuploidia átlagait tekintve nincs jelentős különbség a két, azonos betegekből különböző időben származó minta között.

#### **4. Spermiumok FISH analízise kemoterápiás betegeknél**

A kemoterápiás kezelés hatását a spermiumok aneuploidiájára 3 kemoterápián átesett, tumoros betegnél tanulmányoztuk. Ejakulátumukban a spermiumok morfológiája mindhárom esetben 100%-ban kórosnak bizonyult, a motilitást tekintve két betegnél nem találtunk progresszíven mozgó ivarsejtet, egy betegnél pedig 8%-ban figyeltünk meg. progresszív gyors vagy lassú mozgást. A spermium koncentráció két esetben rendkívül alacsony volt (<1,5 M/ml), a harmadik betegnél pedig 9,9 millió/ml-nek bizonyult. Egy betegnél nem lehetett elvégezni a FISH vizsgálatot az ivarsejtek rendkívül alacsony koncentrációja miatt, 1 férfinél pedig a vizsgált kromoszómákra (18, X, Y) nézve magasabbnak (2%) bizonyult az aneuploidiák előfordulása, mint a kontroll donoroknál. A kemoterápiás kezelés úgy befolyásolja a spermatogenezist, ami a spermium paraméterek (koncentráció, motilitás, morfológia) tekintetében -jelentős mértékben- a hímivarsejtek károsodását idézi elő. *Annak bizonyítására, hogy a kemoterápia milyen mértékben károsítja a spermiumok DNS-ét, az alacsony spermium koncentráció valamint a kis esetszám miatt nem sikerült elég adatot gyűjteni.*

#### **5. Spermiumok FISH analízise transzlokáció hordozó betegeknél**

A szerkezeti kromoszóma-rendellenességek konvencionális citogenetikai módszerekkel valamint FISH-sel kimutathatók a perifériás vérből. A transzlokációk egyrészt az érintett kromoszómák különböző meióziszbeli szegregációja miatt a kiegyensúlyozatlan formában kerülhetnek az érett ivarsejtekbe, ami a magzat súlyos fejlődési rendellenességét eredményezheti. A kromoszóma-átrendeződés másik következménye pedig a spermatogenezis károsodása lehet, amiben – egyes vélemények szerint – a meiózis során a transzlokációs



kromoszómák az X/Y bivalenssel történő asszociálódása játszhat szerepet. A rendellenesség eredményeként gyakran csökkent fertilitásra kell számítani. Amennyiben olyan kombinációban adódnak át az utódba a transzlokációk, hogy a DNS mennyisége is megváltozik (kiegyensúlyozatlan kromoszómaátrendeződés) spontán vetélés és/vagy a magzat fejlődési rendellenessége a következmény. A szegregációs módok ill. a spermatogenezis károsodásának mértéke az adott transzlokációtól függően igen eltérő lehet. A kromoszómaszegregáció módját jelentősen befolyásolja a transzlokálódott kromoszómaszakaszok mérete. Az ivarsejtek kezdeti vizsgálatai arra utalnak, hogy a prezigotikus szelekció kisebb mértékű, míg a rendellenességek szelekciója posztzigotikus időszakban, tehát a terhesség alatt, rendkívül erősen működik. Az újszülöttkorban már csak átlagosan 10% a kromoszómaátrendeződések fejlődési rendellenességet okozó kiegyensúlyozatlan kombinációinak az előfordulása. Az *Y kromoszóma szerkezeti rendellenességei* is idézhetnek elő infertilitással vagy akár a nemi differenciálódás zavarával járó problémákat. Többek között a spermatogenezisért felelős géneket tartalmazó kromoszómaszakaszok deléciónja okozhat azoospermiát. Azok a citogenetikai átrendeződések is a spermatogenezis leállítását eredményezhetik, amelyek a meiózisban az X és az Y kromoszóma közötti párosodást akadályozzák. Az X/Y bivalens a meiózis pachitén fázisában sex vesiculumot képez. Ilyenkor az oogenezistől eltérő módon a két nemi kromoszómán lévő gének inaktiválódnak. Amennyiben ez az inaktiváció elmarad a spermatogenezis leáll. A szerkezeti rendellenesség miatt gyakran az Y kromoszóma egyes sejtvonalakból elveszhet. Az így létrejövő 45,X kariotípusú sejtek arányától függően a Turner-szindróma fenotípusa is kialakulhat.

*Munkánk során 4 beteg perifériás véréből diagnosztizált kromoszóma transzlokáció esetén vizsgáltuk spermiumokból a kromoszómák szegregációját. A 4 transzlokáció hordozó ejakulátum adatait a X. táblázat foglalja össze, a spermiumokból végzett szegregációs analízist pedig a XI. táblázat mutatja be.*

- Első betegünk egy 38 éves férfi volt cryptozoospermiával. Perifériás véréből kiegyensúlyozott Y/3 reciprok transzlokációt diagnosztizáltunk: 46,X,t(Y;3)(q12;p21). A beteg hormonszintjei (FSH, LH, prolaktin és tesztoszteron) a normál tartományban voltak. Spermiumainak FISH vizsgálatával megállapítottuk a káros kromoszómák meiózisban történő szegregációját. A vizsgált minta alapján a genetikailag ép vagy kiegyensúlyozott kromoszóma-szerelvényű spermiumok aránya csupán 29,7%-nak bizonyult. Tekintve hogy a beteg ejakulátumában a spermiumok koncentrációja csak 0,1 millió/ml ( $\geq 20$  millió/ml a

WHO szerinti normálérték) volt, a megtermékenyítés esélye genetikailag ép spermiummal rendkívül alacsony. Amennyiben mégis létrejön a terhesség, a magzat kromoszómális rendellenességének kockázata 70,3%.

- Második betegünk perifériás véréből 1/17-es transzlokációt diagnosztizáltunk: 46,XY,t(1;17)(p11;q11). Az ejakulátum adatok normozoospermiát mutattak. A férfi spermiumaiból FISH-sel megállapítottuk a kóros kromoszómák meiózisban történő szegregációját. A vizsgált minta alapján a genetikailag ép spermiumok aránya 53,7%-nak bizonyult. Betegünk azután kereste fel intézetünket, hogy feleségénél 4 sikertelen ICSI-t hajtottak végre. A feleség terhessége esetén 46,3%-ban lehet számítani a magzat kromoszómális rendellenességére.
- A harmadik beteg kariotípusa: 46,XY,t(13;14)(q10;q10). A spermatogramm oligozoospermiát igazolt (8M/ml). A beteg varicocele műtéten esett át 2002-ben, a hormonszintek (FSH, LH, progeszteron) magasnak bizonyultak. Feleségénél polycisztás ovárium szindrómát és bal oldali petevezető elzáródást diagnosztizáltak. A férj spermiumaiból FISH-sel megállapítottuk a kóros kromoszómák meiózisban történő szegregációját. A vizsgált minta alapján a genetikailag ép és kiegyensúlyozott kromoszóma-szerelvényű spermiumok aránya 90,9 %-nak bizonyult. A feleség terhessége esetén 9,1%-ban lehet számítani arra, hogy a magzat kiegyensúlyozatlan formában örökli a transzlokációt.
- A negyedik beteg kariotípusa: 46,XY,t(4;6)(q31.1;p25). A spermatogramm normozoospermiát igazolt. A vizsgált spermaminta alapján a genetikailag ép és kiegyensúlyozott kromoszóma-szerelvényű spermiumok aránya 54%-nak bizonyult. Betegünk azután kereste fel intézetünket, hogy feleségének 1 spontán vetélése és 2 elhalt terhessége volt mindig a 9. gesztációs héten. Tehát vizsgálatunk alapján megállapítható volt, hogy a feleség terhessége esetén 46%-ban lehet számítani a magzat kromoszómális rendellenességére.
- Felmerült a lehetősége annak, hogy a kromoszóma transzlokációt hordozó férfiak meiózisában a transzlokációs kromoszómák más kromoszómák aneuploidia gyakoriságát is befolyásolják (*interchromosomal effect* – ICE). *Ezért kiegyensúlyozott transzlokációt hordozó betegeink közül háromnál a spermiumok citogenetikai analízisét 18, X és Y kromoszómákra is elvégeztük.* Az első betegünk vizsgálata a rendkívül alacsony spermium koncentráció (0,1 millió/ml) miatt nem volt lehetséges. A 3 transzlokációs beteg diszómia átlagai a 18. kromoszómára 0,13%, az X kromoszómára 0,06%, az Y-ra 0,22% míg az

XY-ra 0,05%, a normozoospermiás csoportéval korrelálnak (0,08%, 0,06%, 0,07%, 0,08% a fent említett kromoszómákra nézve), a diploidia értékek 0,14% és 0,19% a transzlokációs és a kontroll csoport esetében. *Ez azt jelenti, hogy vizsgálataink szerint a transzlokációs kromoszómák nem befolyásolják a többi kromoszóma aneuploidiára és diploidiára való hajlamát.* Eredményeink oka lehet, hogy az ICE csak azokat a transzlokáció-hordozókat érinti (Pellestor), akik kóros ejakulátum paraméterekkel rendelkeznek. A 3 vizsgált esetünk közül kettőnél normozoospermiát igazoltunk, ami bizonyítja ezt a feltételezést. A 3. beteg oligozoospermiásnak bizonyult, akinél azonban a spermiumok motilitása és morfológiája a normál tartományba esett. Ennél a betegnél az Y kromoszóma diszómiáját valamint a diploidia értéket mérsékelten emelkedettnek találtuk.

### **A spermiumok elektronmikroszkópos vizsgálata**

Bár az infertilitás leggyakoribb okai a citogenetikai eltérések és az AZF mutációk, fontos hangsúlyozni, hogy számos más genetikai mutáció is befolyásolja a fertilitást. Így a spermiumok motilitása, a megtermékenyítés folyamata és az ezt követő első sejtosztódások is szoros genetikai kontroll alatt állnak. Úgy tűnt, hogy e genetikai eltérésekre az elektronmikroszkópiával vizsgálható ultrastrukturális elváltozások is hasznos információkkal szolgálnak.

Tekintettel arra, hogy hazai viszonylatban még nem voltak korábbi tapasztalatok, első lépésként a vizsgálati módszer beállítására volt szükség. A második szakaszban a spermiumok szabályos szerkezetének tanulmányozását tűztük ki célul. *Megkezdtük a patológiás elváltozások típusainak vizsgálatát is 30 astheno-teratozoospermiás beteg ejakulátumainak analízisével.* Megállapítható, hogy nem genetikai eredetű esetekben a morfológiai eltérések a megfelelő kezelés hatására potenciálisan javulhatnak. Ezzel szemben a lényegesen ritkább előfordulású, specifikus formában egyetlen jellegzetes anomália uralja a képet, és ez a spermiumok többségében megtalálható. Ezen esetekben genetikai háttér tételezhető fel.

Vizsgálataink megkezdése után nem sokkal azonban az intézet leépítésének részeként az elektronmikroszkópos laboratóriumot is megszüntették, ezért ezekkel a kutatásokkal le kellett állnunk.

## Hasznosítás

Vizsgálataink során számos olyan módszert vezettünk be, amelyekkel az infertilitás genetikai okainak pontosabb diagnózisát lehet megállapítani. A pontos genetikai diagnózis jelentőségei:

1. elkerülhetőek a beteg további fölösleges vizsgálatai, amelyek anyagi és a beteget érő megterhelés szempontjából fontos.
2. Genetikai ok igazolása esetén megjósolható az asszisztált reprodukciós eljárások sikerességi aránya, amely szélsőséges esetben 0 is lehet. Ilyenkor nyilván fölösleges a költséges és a betegeket más szempontból is megterhelő beavatkozásokat elvégezni. Jelen gyakorlat az, hogy a házaspárokat több sikertelen ICSI után küldik genetikai vizsgálatra, pedig ezeknek már az első beavatkozás előtt meg kellene történniük.
3. Genetikai ok tisztázása esetén fenn áll a lehetősége annak, hogy az utód örökli a mutációt, amely gyakran sokkal súlyosabb következményekkel járhat mint a szülőknél. A genetikai kockázatról a házaspárokat tájékoztatni kell, és fel kell világosítani a prenatális, esetleg preimplantációs diagnosztikai lehetőségekről.



**I. táblázat**

	ék	diagn.	here	FSH mIU/ml	LH mIU/ml	Prol ng/ml	Teszt nmol/L	hisztológia	karyo	AZF eredmény
<b>1.</b>	30	azoosp	hypogon.	23,6	11,6	5,1	19,8	SCOS	46,XY	AZF <sub>a</sub> del.(sY84,86,87)
<b>2.</b>	37	azoosp	ép gen.	18	18	6,6	-	-	46,XY	AZF <b>a</b> del. (sY82,84)
<b>3.</b>	36	azoosp	ép gen.	3,6	8,8	20,8	16,8	komplett, korai érési gátlás, atrófia, pr.spermatocit áig	46,XY	AZF <b>b</b> del (sY114,127,134,142)
<b>4.</b>	30	azoosp	ép gen	5,2	4,6	11,4	-	-	46,XY	AZF <b>c</b> del. (sY152,157,158,254,255)
<b>5.</b>	35	azoosp	hypoplasia testis	-	-	-	-	SCOS	46,XY	részl. AZF <b>a</b> del.(sY86,87) kompl. AZF <b>b</b> , <b>c</b> del. ((sY114,127,134,142,152,157, ,158, 254,255)
<b>6.</b>	28	azoosp	ép gen	9,1	5,0	14	14,2		46,XY	AZF <sub>c</sub> sY152, 254, 255, 157, 158

**II. táblázat**

	ék	diagn.	here	FSH mIU/ ml	LH mIU/ ml	Prol ng/ml	Teszt nmol/ L	hisztológia	karyo	AZF eredmény	egyéb
1.	29	azoosp	ép gen.	17,5	5,1	26	20	SCOS	46,X,del(Y) (q11.223)	AZFc del. (sY152,157,158,254,255)	
2.	28	azoosp	atrófiás	26,6	19,7	22,4	11	SCOS atrófia	46,X,del(Y) (q11.223)	AZF <b>b, c</b> del. (sY114,127,134,142,152,157,158, 254,255,160)	
3.	5 hónap	pseudo haermap h.mascul inus		-	-	-	-	-	46,X,idic(Y) /45,X	AZF <b>b, c</b> del. (sY114,127,134,142,152,157,158,254, 255,160)	FISH limfocita:90% 45,X/10% 46,X,idic(Y) szájnyálk.:25% 45,X/75% 46,X,idic(Y)

### III. táblázat

	é.k	genetikai vizsgálat indoka	karyo	AZF eredmény	FISH eredmény
1.	34	amen.I	46,XY	ZFY del. (SRY, AZFa,b,c megvan)	-
2.	17	amen.I csíkgonád	45X/46,X,ish der(Y)	AZFa,b,c teljes deléció, SRY megvan	<u>szájnyálkahártyából:</u> 74% Ycentromerikus régió poz. <u>limfocitából:</u> 65% Ycentromerikus régió poz.
3.	38	amen I	45,X	ZFY poz, SRY, és teljes AZF régió hiányzik.	-
4.	19	amen I.	46,XY	-	<u>limfocitából:</u> 100% XY centromerikus próbákkal pos.
5.	17	amen I.	45,X	-	<u>szájnyálkahártyából:</u> 82% 1X centromerikus próbával pos. 18% XY centromerikus próbákkal pos. <u>limfocitából:</u> 100% 1X centromerikus régió pos.
6.	13	amen I.	-	-	<u>szájnyálkahártyából:</u> 61% 1X centromerikus régió pos. 39% 2X centromerikus régió pos.
7.	18	amen I.	-	-	<u>szájnyálkahártyából:</u> 30% 1X centromerikus régió pos. 70% 2X centromerikus régió pos.
8.	6 hónap	magzatvízből prenatálisan 45,X/46,XX mozaik	-	-	<u>vérkenetből:</u> 20% 1X centromerikus régió pos. 80% 2X centromerikus régió pos. <u>szájnyálkahártyából:</u> 17% 1X centromerikus régió pos. 83% 2X centromerikus régió pos.



**IV. táblázat**

	szül.	diagn	here	FSH mIU/ml	LH mIU/ml	Prol ng/ml	Teszt nmol/L	hisztológia	karyo	AZF eredmény	SRY (FISH)
1.	1967	azoosp.	kisebb 3cm	46	14,6	-	-	atrófia SCOS	46,XX	AZF a, b, c, del. csak SRY és ZFY	-
2.	1975	azoosp.	hypoplasia	19,3	12,4	16,4	14,8	korai érési gátlás pr. spermatoci táig	46,XX	AZF a, b, c, del. csak SRY és ZFY	pos. az X kromoszóm án Ycentr.neg.
3.	1973	azoosp.	hypogon.	53	45,4	28,3	15,4	-	46,XX	AZF a, b, c, del. csak SRY és ZFY	pos. az X kromoszóm án

**V. táblázat**

A 18, X és Y kromoszómák diszómia és diploidia értékei normozoospermiás donorok spermiumai esetén (n=8)

kontroll	X	Y	18/18	X/X	Y/Y	X/Y	diploid	kóros%
átlag (%)	49	50,4	0,09	0,067	0,05	0,06	0,14	0,4
szórás	1,86	1,9	0,08	0,06	0,04	0,07	0,14	0,17
intervallum	(47,3-52)	(47-53,2)	(0-0,2)	(0-0,18)	(0-0,1)	(0-0,2)	(0,05-0,5)	(0,2-0,7)

**VI. táblázat**

A 13. és 21. kromoszómák diszómia és diploidia értékei normozoospermiás donorok spermiumai esetén (n=8)

	13/21	13/13	21/21	diploid	kóros
átlag (%)	99,5	0,15	0,2	0,125	0,48
szórás	0,3	0,11	0,14	0,08	0,3
intervallum	(99-99,84)	(0-0,25)	(0,06-0,5)	(0-0,25)	(0,16-1)

**VII. táblázat**

Infertilis férfiak spermiumainak 18, X, Y kromoszómákra vizsgált diszómia és diploidia értékei

	X	Y	18/18	X/X	Y/Y	X/Y	diploid	kóros%
átlag (%)	49,3	49,31	0,3	0,23	0,33	0,2	0,3	1,36
szórás	1,8	1,85	0,32	0,22	0,25	0,2	0,23	0,86
intervallum	(46,7-54)	(46-53)	(0-0,9)	(0-0,8)	(0-0,8)	(0-1,9)	(0-1,12)	(0,3-5,6)

**VIII. táblázat**

Infertilis férfiak spermiumainak 13. és 21. kromoszómákra vizsgált diszómia és diploidia értékei

	13/21	13/13	21/21	diploid	kóros %
átlag (%)	98,65	0,4	0,65	0,4	1,41
szórás	0,71	0,22	0,42	0,3	0,4
intervallum	(97,3-99,5)	(0,15-0,8)	(0,15-1,3)	(0-0,7)	(0,6-3,1)

**IX. táblázat**

Meddő férfiak 18, X és Y kromoszómákra vizsgált diszómia és diploidia értékei spermiumokban különböző kategóriák szerint (%)

		18/18	X/X	Y/Y	X/Y	diploid	kóros	esetszám
1.	ATS	0,25	0,21	0,37	0,16	0,26	1,30	20
2.	OAS+AS	0,25	0,25	0,38	0,16	0,26	1,30	11
3.	OTS+TS	0,40	0,18	0,33	0,18	0,26	1,35	7
4.	OATS	0,35	0,25	0,28	0,24	0,30	1,42	26
5.	<6 millió	0,31	0,25	0,38	0,26	0,25	1,45	17
6.	<6% mot.	0,31	0,23	0,28	0,20	0,31	1,33	18

**X. táblázat**

A 4 transzlokáció-hordozó beteg ejakulátum adatai

név	életkor (év)	spermium koncentr. (x10 <sup>6</sup> ml)	térfogat (ml)	normal motilitás (%)	normal morfológia (%)	klinikai diagnózis	karyotípus
1.	38	0,1	3,2	0	3	OATS	46,X, t(Y;3)(q12;p21)
2.	41	94	3,6	55	49	NS	46,XY, t(1;17)(p11;q11)
3.	34	8	2	50	30	OS	45,XY, t(13;14)(q10;q10)
4.	25	45	2,5	48	80	NS	46,XY, t(4;6)(q31.1;p25)

***XI.táblázat***

*A 4 transzlokáció hordozó beteg spermiumainak szegregációs analízise*

		Szegregációs mintázat (%)						
		sp.szám	Alternáló	Adjacent II	Adjacent I	3:1	Diploidia	Egyéb
1.	t(Y;3)(q12;p21)	440	29,7	67,3		3		
2.	t(1;17)(p11;q11)	1575	53,7	7	38		13	
3.	t(13;14)(q10;q10)	1629	90,9		8,2		0,7	0,2
4.	t(4;6)(q31.1;p25)	1050	54		33,6	12,2	0,2	