

# Citogenetičke abnormalnosti u muškaraca s neopstruktivnom azoospermijom i teškim oblicima oligozoospermije

---

Jančić, Ana

Master's thesis / Diplomski rad

2019

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **Josip Juraj Strossmayer University of Osijek, Faculty of Medicine Osijek / Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku, Medicinski fakultet Osijek**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:152:039364>

Rights / Prava: [In copyright](#) / [Zaštićeno autorskim pravom.](#)

Download date / Datum preuzimanja: **2024-12-23**



Repository / Repozitorij:

[Repository of the Faculty of Medicine Osijek](#)



**SVEUČILIŠTE JOSIPA JURJA STROSSMAYERA U OSIJEKU**

**MEDICINSKI FAKULTET OSIJEK**

**Sveučilišni diplomski studij medicinsko laboratorijska  
dijagnostika**

**Ana Jančić**

**CITOGENETIČKE ABNORMALNOSTI U MUŠKARACA S  
NEOPSTRUKTIVNOM AZOOSPERMIJOM I TEŠKIM  
OBLICIMA OLIGOZOOSPERMIJE**

**Diplomski rad**

**Osijek, 2019.**

**SVEUČILIŠTE JOSIPA JURJA STROSSMAYERA U OSIJEKU**

**MEDICINSKI FAKULTET OSIJEK**

**Sveučilišni diplomski studij medicinsko laboratorijska  
dijagnostika**

**Ana Jančić**

**CITOGENETIČKE ABNORMALNOSTI U MUŠKARACA S  
NEOPSTRUKTIVNOM AZOOSPERMIJOM I TEŠKIM  
OBLICIMA OLIGOZOOSPERMIJE**

**Diplomski rad**

**Osijek, 2019.**

**Rad je izrađen u: Klinička bolnica „Sveti Duh“, Zagreb**

**Mentor rada: izv. prof. dr. sc. Feodora Stipoljev**

**Rad ima 49 listova, 2 tablice i 11 slika.**

**Zahvale idu:**

**Mojoj obitelji, iako obično hvala nije dovoljno za svu podršku koju ste mi pružili, i prijateljima, jer ne bih bila ovdje bez vaše pomoći.**

## Sadržaj

|   |    |
|---|----|
| 1. UVOD .....   | 1  |
| 1.1. Neplodnost .....   | 1  |
| 1.1.1. Epidemiologija i etiologija .....                                    | 1  |
| 1.1.2. Defektna spermatogeneza .....  | 2  |
| 1.1.3. Dijagnostički postupnici obrade muške neplodnosti .....              | 7  |
| 1.1.4. Teški oblik oligozoospermije .....                                   | 9  |
| 1.1.5. Neopstruktivna azoospermija .....                                    | 10 |
| 1.2. Kromosomski uzroci neplodnosti .....                                   | 12 |
| 1.2.1. Numerički kromosomski poremećaji povezani s muškom neplodnosti ..... | 13 |
| 1.2.2. Strukturni poremećaji povezani s muškom neplodnosti .....            | 14 |
| 2. HIPOTEZA .....   | 17 |
| 3. CILJEVI .....  | 18 |
| 4. MATERIJALI I METODE .....  | 19 |
| 4.1. Ustroj istraživanja .....  | 19 |
| 4.2. Ispitanici .....   | 19 |
| 4.3. Prikaz metoda .....  | 20 |
| 4.3.1. Prometafazna tehnika kultiviranja limfocita periferne krvi .....     | 20 |
| 4.3.2. G-pruganje .....   | 21 |
| 4.3.3. FISH metoda .....  | 23 |
| 4.4. Statističke metode .....   | 26 |
| 5. REZULTATI .....  | 27 |
| 6. RASPRAVA .....   | 37 |
| 7. ZAKLJUČAK .....  | 41 |
| 8. SAŽETAK .....  | 42 |
| 9. SUMMARY .....  | 43 |
| 10. LITERATURA .....  | 45 |
| 11. ŽIVOTOPIS .....   | 49 |

## Popis kratica:

|           |   |
|-----------|---|
| % PP      | udio progresivno pokretnih spermija   |
| % P       | udio pokretnih spermija   |
| % NP      | udio nepokretnih spermija   |
| ASP       | krak specifične sonde za FISH   |
| AZF       | azoospermija faktor na Y kromosomu  |
| CEP       | centromerne sonde za FISH   |
| CGH       | komparativna genomska hibridizacija (engl. <i>Comparative genomic hybridization</i> )                       |
| CLIA      | kemiluminiscentni imunoesej   |
| CNV       | varijacija u broju kopija (engl. <i>Copy-number variation</i> )   |
| DNA       | deoksiribonukleinska kiselina (engl. <i>deoxyribonucleic acid</i> )   |
| FISH      | fluorescentna <i>in situ</i> hibridizacija  |
| FSH       | folikulostimulirajući hormon  |
| FudR      | otopina za sinkronizaciju kulture stanica 5-fluoro-2'-deoksiuridin (engl. <i>5-flouru-2'-deoxyuridine</i> ) |
| ISCN      | (engl. <i>International System for Human Cytogenetic Nomenclature</i> )                                     |
| LH        | luteinizirajući hormon  |
| NGS       | sekvenciranje nove generacije (engl. <i>Next-generation sequencing</i> )                                    |
| PAR1      | pseudoautosomalna regija 1  |
| PAR2      | pseudoautosomalna regija 2  |
| PBS       | fosfatni pufer  |
| pter/qter | telomerne sonde za FISH   |
| RIA       | radioimunoesej  |
| RNA       | ribonukleinska kiselina (engl. <i>ribonucleic acid</i> )  |
| SNP       | polimorfizam pojedinog nukleotida (engl. <i>Single nucleotide polymorphisms</i> )                           |
| WCP       | cjelokromosomske specifične sonde za FISH   |
| XIST      | X kromosom inaktivirajući prijepis (engl. <i>X-inactive specific transcript</i> )                           |
| XCI       | X kromosom inaktivacijski centar  |

## 1.UVOD

### 1.1. Neplodnost

#### 1.1.1. Epidemiologija i etiologija

Prema svjetskoj zdravstvenoj organizaciji, definicija neplodnosti je nemogućnost da seksualno aktivan par koji ne koristi kontracepcijske metode zaštite postigne spontanu oplodnju unutar razdoblja od jedne godine. Neplodnost je javnozdravstveni problem s kojim se sve više parova reproduktivne dobi suočava, a procjenjuje se da čak 48,5 milijuna parova diljem svijeta ima problem s neplodnosti (1). Ona može biti trajna i vremenski ograničena, pri čemu nestaje nakon terapijskog postupka ili prestanka izlaganja rizičnim čimbenicima. Procjenjuje se da taj problem zahvaća čak 15 % reproduktivno sposobnih parova, dok se 20 – 25 % reproduktivnih problema pripisuje muškom čimbeniku. Samo 50 % parova zahvaćenih problemom neplodnosti zatraži liječničku pomoć, a manje od 25 % podvrgava se liječenju. Muška neplodnost obično se definira kao abnormalan rezultat analize sjemene tekućine (2). Kao uzročnici reproduktivnih problema navode se mnoge kongenitalne i stečene urogenitalne abnormalnosti, hormonalni poremećaji, erektilna disfunkcija, infekcije urogenitalnog trakta, antispermalna protutijela, izlaganje štetnim kemikalijama i radijaciji, malignitet, vodene kozice, a može se javiti i kao nuspojava uzimanja lijekova i droga. Kao najčešći uzrok muške neplodnosti nalazi se pogrješka u spermatogenezi. Procjenjuje se da 40 – 50 % neplodnih muškaraca ima kvalitativne ili kvantitativne abnormalnosti proizvodnje sperme, a u više od 60 % tih slučajeva uzrok testikularne disfunkcije ne zna se (3). Među različitim čimbenicima koji su uključeni u nastanak muške neplodnosti, genetički čimbenici jedan su od najčešćih uzroka (4). Negdje oko 15 – 30 % reproduktivnih problema kod muškaraca posljedica je genetičkih abnormalnosti, uključujući kromosomske abnormalnosti i genske mutacije koji na različitim razinama utječu na fiziološke procese muške reprodukcije, kao što su hormonska homeostaza, spermatogeneza i kvaliteta spermija (5). U 30 – 50 % slučajeva muške neplodnosti etiologija je još uvijek nepoznata (6). Muškarci s idiopatskom neplodnošću nemaju povijest neke od bolesti koje utječu na neplodnost, nisu izloženi rizičnim čimbenicima te su fizikalni pregled, genetička, endokrina i biokemijska laboratorijska testiranja uredna, ali analiza njihova sjemena pokazuje patološke promjene (7). Smatra se da na kvalitetu sjemena utječu i različiti čimbenici kao što su rasa, geografski položaj i podrijetlo, način života,



dijabetes, pretilost, itd. Unatoč značajnom napretku u identifikaciji molekularnih mehanizama odgovornih za proces spermatogeneze i razvoju tehnika potpomognute oplodnje, uzrok muške neplodnosti često ostaje nepoznat i nakon završetka liječenja.

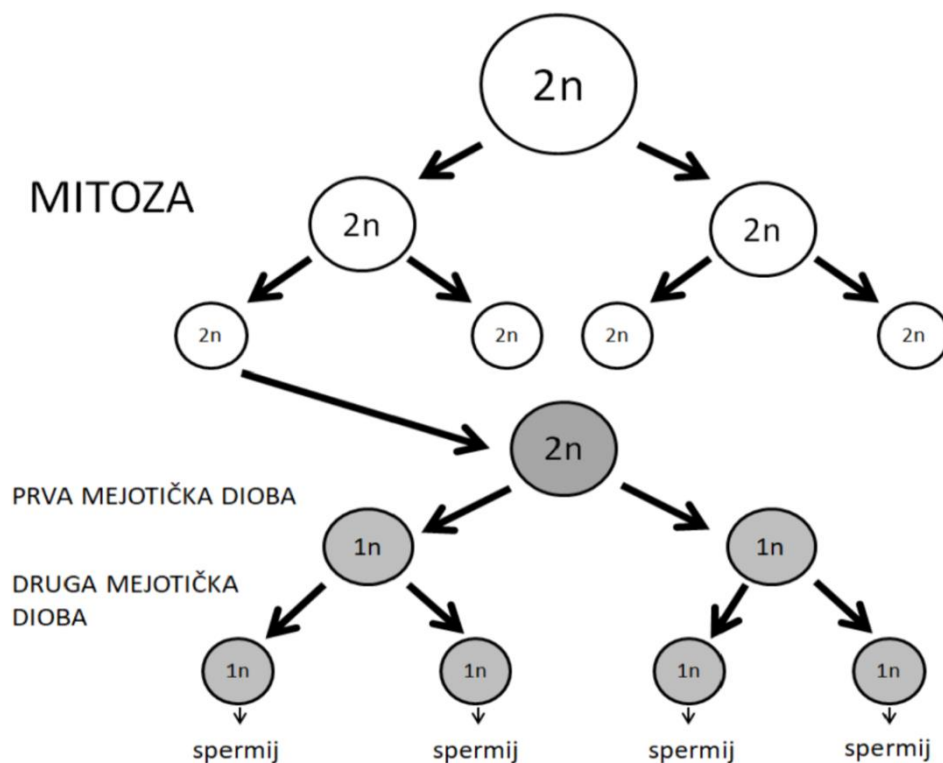
### 1.1.2. Defektna spermatogeneza

Spermatogeneza je jedan od najsloženijih procesa diferencijacije stanica, koji uključuje 2,300 gena u regulaciji razvoja testisa te razvoju i sazrijevanju zametnih stanica (8). Kompleksan proces stvaranja spermatozoida koji se odvija u sjemenim kanalićima testisa traje 72 dana, a tek nakon prolaska kroz epididimis spermatozoidi su pokretljivi i spremni za oplodnju. Spermatogeneza je strogo kontrolirani proces koji ima ključnu ulogu u procesu reprodukcije. Kako bi se osigurao normalan broj kromosoma kod potomaka mejotičkom diobom, stvaraju se četiri jednako vrijedne haploidne gamete koje imaju samo po jedan kromosom svakog para i koje se u procesu oplodnje spajaju s haploidnom jajnom stanicom te stvaraju diploidnu zigotu. Cijeli proces spermatogeneze započinje mitotičkom proliferacijom spermatogonija, zatim dolazi prva mejotička dioba spermatocita te kao posljednji korak haploidna diferencijacija spermatida, poznatija kao druga mejotička dioba. Svrha je mejoze reducirati broj kromosoma s 46 na 23 u zrelih spolnim stanicama. Redukcija broja kromosoma događa se tijekom dviju uzastopnih diobi jezgre i stanica koje slijede nakon samo jedne replikacije DNA, gdje mejoza I započinje završetkom S-faze, odnosno, završenom DNA replikacijom roditeljskih kromosoma (9). U profazi I prve mejotičke diobe dolazi do sparivanja homolognih kromosoma uz pomoć sinaptičkog kompleksa uz iznimku XY para, gdje se sparivanje događa samo u pseudoautosomalnoj regiji. U procesu *crossing-overa* ili rekombinacije, koji uključuje izmjene dijelova homolognih kromosoma, dolazi do zamjene gena između dvaju homolognih kromosoma na mjestu rekombinacijskih čvorića. U metafazi I kromosomi se slažu u ekvatorijalnu ravninu, dolazi do raspadanja jezgrine ovojnice i stvaranja diobenog vretena. Početkom anafaze I homologni kromosomi odvajaju se i putuju prema suprotnim polovima stanice, a završetkom telofaze I svaki pol stanice ima haploidan broj kromosoma. Nastaju dvije stanice kćeri, odnosno, sekundarne spermatocite. Rezultat su prve mejotičke diobe dvije stanice s haploidnim brojem kromosoma. Druga je mejotička dioba odvajanje sestrinskih kromatida svakog kromosoma. Druga mejotička dioba ima kratku profazu II u kojoj se formira diobeno vreteno, u metafazi II kromosomi su u ekvatorijalnoj ravnini, u anafazi II veze između kromatida popuštaju i one putuju prema suprotnim polovima

stanice, da bi u telofazi II kromatide bile na suprotnim polovima i formirala se jezgrina ovojnica, tj. dvije spermatide. Rezultat su cjelokupnog procesa mejoze četiri stanice s haploidnim brojem kromosoma, odnosno spermiji, a cjelokupni proces spermatogeneze shematski je prikazan na Slici 1. U bilo kojoj od navedenih faza može doći do greške, uslijed čega dolazi do nastanka različitih tipova kromosomskih abnormalnosti (10). Greške u spermatogenezi događaju se najčešće u anafazi kada se spareni kromosomi ili kromatide ne razdvoje, ali se isto može dogoditi ako se homologni kromosomi uopće ne spoje ili ako se sestrinske kromatide razdvoje prerano i segregiraju u istu stanicu kćer neovisno jedna od drugoj (11). Greške nerazdvajanja (engl. *non-disjunction*) u mejozi dovode do stvaranja gameta s numeričkim kromosomskim abnormalnostima, dok greške sparivanja u mejozi I mogu dovesti do *crossing-overa* između nehomolognih kromosoma i stvoriti strukturno abnormalne kromosome. Mitotske greške nerazdvajanja dovest će do stvaranja numeričkih kromosomskih abnormalnosti (11).

Numerički poremećaji, posebice aneuploidije, u pravilu nastaju mehanizmom kromosomskog nerazdvajanja, a rjeđe anafaznog zaostajanja. Različiti su oblici kromosomskog nerazdvajanja, a svi rezultiraju promjenom broja kromosoma. Primarno i sekundarno nerazdvajanje odvija se tijekom mejoze: primarno nerazdvajanje je kada je zametna stanica euploidna, a sekundarno kada je zametna stanica već aneuploidna. Mitotičko nerazdvajanje odvija se u postzigotičkoj fazi ili prvoj diobi zigote. Nastaju u pravilu dvije stanične linije od kojih je jedna aneuploidna, a druga euploidna, što se naziva mozaicizmom. Kod nerazdvajanja spolnih kromosoma može biti prisutno više različitih aneuploidnih staničnih linija. U anafaznom zaostajanju, pojedini kromosom tijekom anafaznog razdvajanja zaostane i ne dođe na pol diobenog vretena s drugim kromosomima, pa nije uključen u stvaranje nove jezgre, što stvara stanice s numeričkim kromosomskim poremećajem.

Poremećaji spermatogeneze uzrokuju stvaranje kromosomskih abnormalnosti kako broja tako i strukture kromosoma u gametama i dovode do spontanih pobačaja ili stvaranja potomaka s različitim tipovima kromosomskih poremećaja.



Slika 1. Proces spermatogeneze prikazan kroz broj kromosoma u gametama.

U većini slučajeva poremećaj spermatogeneze primaran je testikularan proces. Testikularna produkcija testosterona i inhibina B smanjena je, što rezultira smanjenim mehanizmom negativne povratne sprege, te dolazi do pojačane produkcije gonadotropina u hipofizi, zbog čega se dogodi da je FSH povišen, a testikularni volumen smanjen. Folikulostimulirajući hormon (FSH) izravno djeluje na spermatogenezu i neophodan je za početak stvaranja spermatozoida, a luteinizirajući hormon (LH) utječe na stvaranje testosterona. Nedostatak testikularne funkcije nastaje kao posljedica poremećaja primarne spermatogeneze, a klinički se očituje kao teški oblik oligozoospermije ili azoospermije (7). Etiologija je često nepoznata, a pretpostavlja se da su neki od uzročnika testikularna torzija, trauma, sistematske bolesti, različite bolesti kao što su ospice i vodene kozice te različite genetičke abnormalnosti (kromosomske abnormalnosti i Y-kromosomske mikrodelecije).

X kromosom igra važnu ulogu u spermatogenezi jer sadrži velik broj gena koji upravljaju različitim stadijima razvoja muškog spolnog sustava, a osobito važnu ulogu imaju u sazrijevanju zametnih stanica (12). Jedini X kromosom koji muškarac posjeduje može se naslijediti samo od majke, stoga će se svi geni koji se nalaze na tom kromosomu ispoljiti, bilo da su recesivni ili dominantni. Kako su geni na X kromosomu prisutni u monoalelnom obliku

kažemo da su muškarci hemizigoti za svojstva na X kromosomu. Jedan X kromosom kod žena bit će transkripcijski inaktivan kako bi ekspresija gena kod muškaraca i žena bila uravnotežena (13). Proces X kromosom inaktivacije odvija se u ranoj fazi razvoja stanice epigenetskim mehanizmima, kao što je metilacija. Metilacija DNA dovodi do inhibicije transkripcije, a odvija se u oogenezi i spermatogenezi. Proces inaktivacije X kromosoma naziva se lionizacijom, a regulira ga nekoliko različitih čimbenika, uključujući i regiju na X kromosomu nazvanu XIC (X kromosom inaktivacijski centar) koja sadrži *XIST* (engl. *X-inactive specific transcript*) i regulirajuće elemente. U kromosomskoj regiji Xq13 na dugom kraku X kromosoma nalazi se *XIST* koji kodira dugu funkcionalnu nekodirajuću molekulu RNA odgovornu za utišavanje genske ekspresije i inaktivaciju jednog X kromosoma. *XIST* RNA se prepisuje na X kromosomu koji će biti inaktiviran, veže na sebe represivni proteinski kompleks i onemogućuje pristup transkripcijskim čimbenicima, a utišani X kromosom heterokromatinizacijom pretvori se u takozvano Barrovo tjelešce. Taj proces osigurava postojanje samo jedne funkcionalne kopije gena.

Smatra se da je *XIST* aktivnost regulira Tsix koja je duga nekodirajuća RNA komplementarna sekvenci *XIST* i transkribira se u smjeru suprotnom od RNA *XIST*. Ekspresija *XIST* počinje prije implantacije i nastavlja se tijekom životnog vijeka svih tjelesnih stanica. Proces inaktivacije X kromosoma nasumičan je i ireverzibilan proces, osim tijekom oogeneze, kada je reverzibilan. Tada, X kromosomi koji su bili aktivni, budu inaktivirani zbog ekspresije *XIST* koji pakira DNA u oblik fakultativnog heterokromatina i onemogućava pristup transkripcijskim čimbenicima. Nakon razvoja blastocite i pluripotentnih stanica, dolazi do reaktivacije inaktiviranog X kromosoma zbog smanjene regulacije *XIST*.

Kako na inaktiviranom X kromosomu postoje geni koji nisu utišani, doći će do poremećaja ravnoteže gena, što objašnjava defekte s abnormalnim brojem X kromosoma, kao što je Klinefelterov sindrom. Kako bi se uravnotežila udvostručena ekspresija gena PAR1 (pseudoautosomalna regija 1) i PAR2 (pseudoautosomalna regija 2) regije, modulira se aktivnost RNA *XIST*, no ipak veliki dio gena izbjegne XCI regulaciju, pojačavajući fenotipske osobitosti Klinefelterova sindroma. X kromosom ima bitnu ulogu i u različitim strukturnim razmještanjima s autosomima. Kod translokacija između autosoma i X kromosoma strukturno razmještanje je u morfološki balansiranom obliku, ali ne epigenetski zbog mehanizma inaktivacije X kromosoma, odnosno ovisno o položaju XIC-a u odnosu na mjesto loma na X kromosomu. Oko 15 % gena izbjegava inaktivaciju, a nalaze se u pseudoautosomalnim regijama (PAR1 i PAR2). To su homologne regije na X i Y kromosomu koje omogućavaju

regulaciju genske ekspresije i stupaju u rekombinaciju u *crossing-overu* u spermatogenezi, što se pokazalo nužnim za normalnu mušku plodnost.

Budući da se pretpostavlja da vrlo velik broj gena određuje funkcionalnost spermatogeneze, sigurno je za pretpostaviti da su neki od genetičkih uzroka defektne spermatogeneze mutacije i polimorfizmi različitih gena koji upravljaju spermatogenezom. Unatoč intenzivnom istraživanju, ni jedna klinički značajna mutacija osim mikroleucije Y kromosoma nije dokazana. Mikroleucije na Y kromosomu mogu biti uzrokovane točkastom mutacijom ili varijacijom u broju kopija. Točkasta mutacija označava promjenu, deleciju ili umetanje jedne baze nukleotida u sekvenci DNA. One uglavnom za posljedicu imaju promjenu strukture proteina jer se, promjenom jedne purinske ili pirimidinske baze, mijenja aminokiselina koju ti nukleotidi kodiraju. Strukturne varijacije su promjene u strukturi genomske DNA. Mogu biti stabilne promjene kao što su recipročne translokacije, ili promjenjive kao što su varijacije broja kopija (CNV). Varijacije u broju kopija (CNV) su strukturne varijacije, ponavljajući dijelovi genomske DNA, čiji broj kopija varira od čovjeka do čovjeka (14). Najčešće nastaju kao posljedica duplikacija i delecija. Varijacije u broju kopija mogu se nasljeđivati ili pojavljivati *de novo* u genomu (15). CNV mogu biti benigni, patološki i nepoznatog značenja. Benigne varijacije u broju kopija nalaze se u općoj populaciji i normalne su promjene koje uzrokuju genetsku raznolikost, dok su patološki CNV-i strukturne promjene koje utječu na fenotip pacijenata. CNV može utjecati na ekspresiju gena unutar genomske regije koju obuhvaća, a jedna od najčešćih posljedica varijacija u broju kopija je promjena broja kopija gena. Y-kromosomski vezani CNV-i (kao što su delecije AZF regije i *gr/gr* delecija) imaju očiti funkcionalni utjecaj na spermatogenezu gubitkom AZF gena (14).

Osobitosti defektne spermatogeneze očituju se u primarnom testikularnom poremećaju i teškoj oligozoospermiji i brojem spermija manjim od 5 milijuna/L u ejakulatu ili azoospermiji sa smanjenom endokrinom i egzokrinom funkcijom. Muškarci će u pravilu imati i male, atrofične i mekane testise, normalan volumen sjemena i normalan pH sjemena, a povišen FSH (16).

### 1.1.3. Dijagnostički postupnici obrade muške neplodnosti

Kod obrade neplodnosti oba partnera moraju se istodobno podvrgnuti kliničkoj obradi i laboratorijskim pretragama, pri čemu se kod muškaraca obavlja detaljan klinički pregled kako bi se utvrdilo postoji li deficit hormona androgena te se obavlja pregled veličine i konzistencije testisa, što je vrlo važno za njihovu pravilnu funkciju. Razina serumskog folikulostimulirajućeg hormona (FSH), luteinizirajućeg hormona (LH), testosterona i prolaktina te estradiola mjeri se koristeći kemiluminiscentni imunoesej (CLIA) i radioimunoesej (RIA) te se dobivene vrijednosti uspoređuju s referentnim vrijednostima. Analiza ejakulata daje podatke o boji, koagulaciji, pH, broju spermija, morfologiji spermija, njihovoj pokretljivosti, sposobnosti preživljavanja, a kemijskom obradom utvrđuje se sastav i razina hormona, DNA, imunološko stanje, sposobnost prodiranja kroz sluzavi čep rodnice, itd. Odluke o liječenju temelje se na analizi sjemena, stoga je važno pratiti odrednice o standardizaciji koje izdaje Svjetska zdravstvena organizacija. Abnormalni parametri analize sjemena nisu konačni indikatori muške neplodnosti, ali koreliraju s nižom vjerojatnošću začeca (8). Ako su rezultati analize sjemena normalni prema kriterijima Svjetske zdravstvene organizacije, jedan je test dovoljan, no ako su rezultati abnormalni u posljednja dva testiranja, potrebna je daljnja obrada (7). Najvažniji parametar analize sjemena za ovo istraživanje je ukupan broj spermija u ejakulatu te je prema njemu napravljena podjela u dvije skupine: azospermija i oligozoospermija. Prema Svjetskoj zdravstvenoj organizaciji, normozoospermija označava vrijednosti iznad  $15 \times 10^6$  stanica/mL, dok se sve ispod te vrijednosti klasificira kao oligozoospermija. Kao azospermija klasificira se potpuni nedostatak spermija u ejakulatu. Analiza sjemene tekućine napravljena je prema standardima Svjetske zdravstvene organizacije (17).

Citogenetička analiza radi se kao dio rutinske evaluacije neplodnih muškaraca kako bi se uočili kromosomski numerički i strukturni poremećaji. Kromosomske abnormalnosti, Y-kromosomske mikrolecije i mutacije gena regulatora transmembranskog konduktora cistične fibroze (CFTR) već su dobro utvrđeni uzroci muške neplodnosti (17). Međutim važnim čimbenicima pokazali su se i nedostatak protamina, oštećenje DNA u spermijima i genske mutacije (4). Iako se procjenjuje da genetički čimbenici pridonose i do 10 – 15 % uzroka muške neplodnosti, analiza kariotipa, detekcija mutacije cistične fibroze i analiza Y-kromosomske mikrolecije rutinski su genetički testovi dostupni u kliničkoj obradi muške neplodnosti (5). Testiranje na mikrolecije Y kromosoma radi se kod neplodnih muškaraca s

teškim oblikom oligozoospermije i azoospermije, i uključuje AZFa, AZFb i AZFc regije. Prisutnost palindromske sekvence i homolognih rekombinacija vodi do djelomične ili potpune delecije tih regija (18). Određene delecije na Y kromosomu, uključujući i najčešću gr/gr deleciju, neće nužno dovesti do neplodnosti, nego su rizični čimbenik (19). Međutim, svaka AZF regija sadrži određene gene koji igraju ulogu u spermatogenezi, stoga delecija ili djelomična delecija određene AZF regije može dovesti do potpunog zastoja u spermatogenezi i samim time do azoospermije ili teškog oblika oligozoospermije.

Mutacijski panel za cističnu fibrozu radi se kod unilateralne i bilateralne ageneze *vas deferensa*. *CFTR* je gen koji omogućava stvaranje proteina koji se naziva regulator transmembranske provodljivosti cistične fibroze. On kodira membranski protein koji djeluje kao ionski kanal i utječe na formaciju ejakulatornog kanala, sjemenskih mjehurića, *vas deferensa* i distalne dvije trećine epididimisa (7). Ovisno o tipu azoospermije određuje se tip genske analize, tako da se kod opstruktivne azoospermije radi analiza *CFTR*, a u neopstruktivnoj azoospermiji preporučuje se kariotipiziranje i testiranje na Y-kromosomske mikrodelecije (20).

Ako je nakon citogenetske obrade potrebna daljnja evaluacija mozaičnih oblika ili kriptičkih translokacija, to se radi metodom fluorescentne *in situ* hibridizacije (FISH), koja se koristi kromosomski specifičnim DNA sondama za detekciju različitih tipova numeričkih kromosomskih promjena i analizu točaka loma u strukturnim razmještanjima (5). FISH je među prvim široko korištenim metodama za probir aneuploidija u ljudskim embrijima, u početku korišten zbog brze uporabe na stanicama u interfazi (21). Metoda se može primijeniti na vizualizaciju metafaznih kromosoma i interfaznih jezgri. Specifičnost određuje dužina DNA sonde, pa se češće koriste kraće DNA sonde (10 – 25 nukleotida) za određivanje ciljne sekvence. Razlikujemo centromerne (CEP), cjelokromosomske (WCP), krak specifične (ASP), mjesno specifične i telomerne (pter/qter) sonde koje se koriste pri ispitivanju kromosomskih abnormalnosti. Ako je cilj utvrđivanje preciznog udjela stanične linije s određenim tipom numeričke kromosomske abnormalnosti kod pacijenta, koristit će se sonde pericentromerne regije sastavljene od ponavljajućih sekvenci. Ponekad se centromerne sonde koriste u kombinaciji s mjesno specifičnim sondama koje se vežu za određenu regiju na kromosomu kada se želi utvrditi mjesto loma kod strukturnih razmještanja. Kromosom specifične sonde sastavljene su od manjih sonde od kojih se svaka veže za drugačiju sekvencu na određenom kromosomu i tako omogućava stvaranje cijele slike određenog kromosoma.

Citogenetska analiza preporučuje se ako u povijesti bolesti obitelji ima ponavljajućih spontanih pobačaja, malformacija ili slučajeva mentalne retardacije te kod idiopatske neplodnosti kada su drugi mogući uzroci isključeni. Kod pacijenata na citotoksičnoj kemoterapiji ili izloženih radijaciji ne preporučuje se testiranje (16). Nova genomska testiranja mogu otkriti predispozicije za druga medicinska stanja osim neplodnosti (22).

#### **1.1.4. Teški oblik oligozoospermije**

Oligozoospermija označava stanje znatno smanjenog broja prisutnih spermija u sjemenoj tekućini ( $< 15 \times 10^6$  stanica/mL) i vrlo se često pojavljuje vezano uz dijagnozu neplodnosti kod muškaraca. Dijagnoza se postavlja na temelju rezultata barem dvaju spermograma sjemene tekućine skupljene u minimalnom razmaku od 3 dana (23), u kojima je broj spermija u sjemenoj tekućini ispod  $15 \times 10^6$  stanica/mL. Oligozoospermiju se može podijeliti na blagi, srednji i teški oblik. U blagom obliku broj spermija je  $10 - 15 \times 10^6$  stanica/mL, nema prevelike promjene u hormonskom sastavu niti značajnog rizika za postojanje genetičkih abnormalnosti. U srednjem obliku oligozoospermije broj spermija padne do  $5 \times 10^6$  spermija/mL, a plodnost postaje sve slabija, dok se rizik za postojanje genetičkih abnormalnosti obrnuto proporcionalno povećava kako se broj spermija smanjuje. Teški oblik oligozoospermije sadržava  $< 5 \times 10^6$  spermija/mL, plodnost je vrlo mala i teško ostvariva bez dodatnih terapijskih postupaka, a rizik za postojanje genetičkih abnormalnosti značajno je viši. Numeričke i strukturalne kromosomske abnormalnosti javljaju se u 5 do 15 % azoospermičnih muškaraca (24, 25) U istraživanju Foresta i suradnika (26) pojavnost kromosomskih poremećaja iznosila je 13,9 % kod muškaraca s teškim oblikom oligozoospermije. Smatra se da postotak varira među istraživanjima zbog različitih uključnih kriterija i različite interpretacije citogenetičkih rezultata (2). Također se uočava značajna razlika u pojavnosti genetičkih abnormalnosti između slučajeva blagog oblika oligozoospermije i teškog oblika oligozoospermije. U slučajevima teškog oblika oligozoospermije češće se pojavljuju strukturni kromosomski poremećaji kao što su Robertsonove translokacije, inverzije i delecije, u odnosu na numeričke kromosomske poremećaje kao što je mozaični oblik Klinefelterovog sindroma ili sindroma dvostrukog Y kromosoma.



Pokretljivost spermija svrstava se u tri grupe: progresivno pokretni (% PP), pokretni (% P) i nepokretni (% NP). Stanice koje su u aktivnom kretanju u linearnoj putanji ili u velikim krugovima pripadaju skupini progresivno pokretnih, a sve ostale stanice koje se kreću u drugim, manjim putanjama, pripadaju skupini (neprogresivno) pokretnih (27). Pojam astenozoospermije označava smanjen udio progresivno pokretnih spermija u ejakulatu (manje od 40 %), a sukladno tome oligoastenozoospermija označava smanjen broj spermija u ejakulatu i njihovu smanjenu pokretljivost. Ako je manje od 40 % progresivno pokretnih spermija, iznimno je važan test vitalnosti u kojem se, bojanjem ili izazivanjem hipotoničnog nabubrenja stanice, provjerava membranski integritet spermija. Najčešće se vitalnost procjenjuje testom eozinom ili eozin-nigrozinom, gdje su glave živih stanica obojene bijelo ili svjetlo ružičasto, a ako je membrana puknuta glave su crvene ili tamno ružičaste. Ako bojanje spermija nije moguće, koristi se test hipoosmotskog bubrenja gdje unutar pet minuta rep stanice nabubri ako je spermij vijabilan (27). Ako je postotak spermija normalnog oblika manji od 15 %, koristi se pojam teratozoospermije.

Sjeme ima dvije važne kvantitativne osobine: ukupan broj spermija (to odražava produkciju sperme u testisima) i ukupan volumen tekućine iz različitih žlijezda koji pokazuje sekretornu aktivnost žlijezda. Priroda spermija (njihova vitalnost, motilitet i morfologija) te sadržaj sjemene tekućine također su vrlo važni za procjenu funkcionalnosti sperme (27).

### **1.1.5. Neopstruktivna azoospermija**

Azoospermija se definira kao potpuna odsutnost spermija u ejakulatu. Pojavljuje se u 10 – 15 % neplodnih muškaraca, a dijeli se na opstruktivnu i neopstruktivnu azoospermiju. Zbog odabira terapijskog postupka vrlo je bitno razlikovati opstruktivnu od neopstruktivne azoospermije. Neopstruktivna azoospermija predstavlja poremećaj spermatogeneze uzrokovan slabim podražajima procesa gonadotropinima ili unutrašnjim oštećenjem testisa, a dijagnosticira se kod 10 % pacijenata s azoospermijom. Povijest bolesti i fizikalni pregled, uključujući skrotalnu evaluaciju i laboratorijske nalaze, često dovode do pronalaska uzroka azoospermije. Ako je prisutna opstrukcija izlaznog kanala na bilo kojem mjestu između testisa i ejakulacijskih kanala, riječ je o opstruktivnoj azoospermiji, a njezin fenotip odlikuje se normalnim testikularnim volumenom i normalnim serumskim FSH (22). Ona se pojavljuje rjeđe od neopstruktivne azoospermije. Neki protokoli azoospermiju klasificiraju još i prema

mjestu nastanka poremećaja koji dovodi do azoospermije na pretestikularnu (opstruktivna azoospermija), testikularnu i posttestikularnu kategoriju (neopstruktivna azoospermija). Većina pacijenata s azoospermijom ima kliničke i laboratorijske dokaze smanjenog izlučivanja androgena, ali gotovo polovica ima normalan broj serumskog testosterona, dok vrijednosti gonadotropina budu blago povišene. Azoospermija je fenotipska manifestacija u kojoj su prisutna barem tri različita tipa histologije testisa: aplazija zametnih stanica (sindrom samo Sertolijevih stanica), spermatogenetski zastoj u različitim stadijima sazrijevanja zametnih stanica i hipospermatogeneza (14). Aplazija zametnih stanica stanje je u kojem u testisima postoje samo Sertolijeve stanice, a očituje je neplodnošću, vrlo reduciranom ili odsutnom spermatogenezom.

Pacijenti sa smanjenim brojem spermija i neopstruktivnom azoospermijom imaju veći rizik od kromosomskih abnormalnosti (2). Iako je neopstruktivna azoospermija uzrokovana mnoštvom različitih čimbenika, kao što su povišena temperatura, izlaganja radijaciji, droge, vodene kozice, infekcije i karcinomi, genetički uzroci značajno pridonose razvoju poremećaja, i to u 21 – 28 % slučajeva. Genetički uzroci testikularne neopstruktivne azoospermije uključuju kromosomske abnormalnosti, mikroleucije Y kromosoma, poremećaj razvoja zametnih stanica, poremećaj diferencijacije zametnih stanica u spermatogonije, mutaciju muške linije zametnih stanica, što je podijeljeno na mutacije koje kontroliraju transkripciju, transdukciju, apoptozu, odgovor stanice na stresore, citokine, imunizaciju zametnih stanica, epigenetičke čimbenike i mutacije androgenih receptora (20). Najčešća kromosomska abnormalnost koja je javlja kod neopstruktivne azoospermije je Klinefelterov sindrom, a drugi su najčešći genetički uzrok poremećaja spermatogeneze Y-kromosomske mikroleucije unutar AZF regije, poznate i kao „čimbenici azoospermije“ u kojoj je do sada izolirano 12 gena. Mikroleucije Y kromosoma delecije su AZF regije koja sadržava gene značajne za spermatogenezu. Čak 60 % muškaraca s neopstruktivnom azoospermijom, koji kao uzrok imaju Y-kromosomsku mikroleuciju, nisu sposobni za proizvodnju spermija (22). Molekularna dijagnostika mikroleucija postala je rutinski dijagnostički postupak u obradi muške neplodnosti i daje prognostičku vrijednost parovima koji se žele podvrgnuti metodama potpomognute oplodnje (28).

## 1.2. Kromosomski uzroci neplodnosti

Najčešći genetički uzročnici neopstruktivne azoospermije i teških oblika oligozoospermije su, od numeričkih kromosomskih poremećaja Klinefelterov sindrom te različiti tipovi strukturnih kromosomskih abnormalnosti (12). Balansirane recipročne autosomne translokacije, inverzije i duplikacije nalaze se češće u skupini neplodnih muškaraca (8). Procjenjuje se da čak 15 % neplodnih muškaraca nosi neku od kromosomskih abnormalnosti, uključujući strukturne i numeričke abnormalnosti, a učestalost kromosomskih abnormalnosti kod slabo plodnih muškaraca procjenjuje se na 2 – 10 %, a kod slučajeva azoospermije može doseći i 10 – 19 % (29).

Greške u mejozi i mitozu te mehanizmima popravka krivo sparenih baza DNA, mogu dovesti do poremećaja broja i strukture kromosoma (11).

Pojavu više različitih linija stanica u organizmu koje su potekle iz jedne zigote, a zbog mutacijskog događaja stvaraju stanične linije različitog kariotipa naziva se mozaicizmom. Primjerice, mitotičkim nerazdvajanjem u ranoj postzigotičkoj fazi nastaju stanične linije s poremećenim brojem kromosoma. Razlikuje se gonadni i somatski mozaicizam. Gonadni mozaicizam stanje je u kojem matične stanice, iz kojih nastaju spolne stanice, mutiraju i stvore različite stanične linije. Somatski mozaicizam promjene su u tjelesnim stanicama koje se ne prenose na potomstvo.

Neka su strukturna razmještanja balansirana, bez gubitka ili suviška kromosomskog materijala i uglavnom nemaju utjecaj na razvoj, dok se nebalansirana strukturna razmještanja povezuju s određenim stupnjem oštećenja u razvoju (11). Relativna učestalost stvaranja balansiranih i nebalansiranih gameta ovisi o tipu razmještanja, kromosomima i veličini regija koje su uključene u razmještanja, prisutnosti heterokromatina, lokaciji mjesta loma i vjerojatnosti da se rekombinacija dogodi unutar translociranih segmenata (2). Oblici balansiranih razmještanja su inverzije, recipročne translokacije i Robertsonove translokacije, koje su ujedno i najčešći oblik razmještanja, dok su delecije i duplikacije oblici nebalansiranih razmještanja.

### 1.2.1. Numerički kromosomski poremećaji povezani s muškom neplodnosti

Aneuploidija je promjena broja jednog ili više kromosoma, a najčešće nastaje kao posljedica nerazdvajanja kromosoma ili kromatida, a uzrokuje fenotipske abnormalnosti koje ovise o tome koji je tip kromosomskog segmenta u suvišku ili manjku. Povišena je pojavnost aneuploidije kod muškaraca s neopstruktivnom azoospermijom, osobito spolnih kromosoma (24). Aneuploidne gamete predstavljaju vrlo važan rizični čimbenik, ne samo za neplodnost nego i pojavnost spontanih pobačaja te fetalne patologije (5). Česte su aneuploidije spolnih kromosoma, od kojih se izdvajaju Klinefelterov sindrom, varijacije Klinefelterovog sindroma kao što je mozaični oblik 47,XXY / 46,XY, koji utječu na mušku neplodnost.

Najčešći numerički poremećaj koji se sustavno pojavljuje kod neplodnih muškaraca je Klinefelterov sindrom, koji je ujedno i najčešća aneuploidija spolnih kromosoma. Pojavnost Klinefelterovog sindroma kod azoospermičnih muškaraca procjenjuje se na 10 %, a kod muškaraca s teškim oblikom oligozoospermije na 5 % (24). Procjenjuje se da 1 od 600 muškaraca u općoj populaciji ima Klinefelterov sindrom, čiji je najčešći kariotip 47,XXY. Odlike Klinefelterovog sindroma su fenotipski različite i variraju na temelju razine testosterona, ali svi imaju atrofične testise i karakterističnu abnormalnu egzokrinu i endokrinu funkciju koja podrazumijeva povišene razine LH, FSH i smanjenu vrijednost testosterona te azoospermiju (16). Iako citogenetičke analize limfocita periferne krvi predstavljaju zlatni standard za potvrdu Klinefelterovog sindroma, interfazni FISH s različitim linijama somatskih stanica (kao što su stanice bukalne sluzi) može biti korišten za potvrdu kromosomskih mozaicizama, gdje citogenetička analiza limfocita iz periferne krvi prikazuje normalan kariotip kod pacijenata kod koji se sumnja na Klinefelterov sindrom (30). Mehanizmi neplodnosti u Klinefelterovom sindromu uključuju nedostatak potencijala za rast testisa, preuranjenu degeneraciju prvobitnih zametnih stanica prije puberteta te preuranjeno ili zakašnjelo zaustavljanje sazrijevanja spermatoocite u primarnoj fazi spermatogeneze, a može utjecati i na kasnije stadije razvoja spermija (20). Oko 80 % slučajeva Klinefelterovog sindroma imaju kariotip 47,XXY (30).

48,XXXXY sindrom i 49,XXXXXY sindrom varijante su Klinefelterovog sindroma, ali teže kliničke slike. Neke od karakteristika obaju sindroma jesu intelektualne poteškoće, hipotonija, hipogonadizam, specifične crte lica te neki urođeni defekti koji mogu utjecati na spolni i mišićno-koštani sustav u razvoju. Azoospermija je prisutna i kod 48,XXXXY sindroma i kod 49,XXXXXY sindroma, a uzrokovana je defektom u razvoju testisa.

Mozaični oblici Klinefelterovog sindroma nastaju slučajnom greškom prilikom mitotske diobe stanica, rezultirajući u tome da jedna stanica ima jedan X i jedan Y kromosom (46,XY), a druga ima dodatnu kopiju X kromosoma (47,XXY). Fenotipski, mozaični oblik Klinefelterovog sindroma ovisi o udjelu abnormalnih stanica. Također, mogu biti plodni zbog prisutnosti kromosomski normalnih stanica (30).

### 1.2.2. Strukturni kromosomski poremećaji povezani s muškom neplodnosti

Najčešće su autosomalne strukturne abnormalnosti Robertsonove translokacije, recipročne translokacije i paracentrične inverzije, a nositelji poremećaja redovito su zdrave osobe, kojima je jedini znak poremećaja smanjena plodnost. Broj spermija u strukturnim poremećajima varira od normozoospermije do potpune azoospermije (10). Strukturna razmještanja sa sobom nose povećani rizik od nastanka nebalansiranih razmještanja, kao što su parcijalne trisomije ili monosomije te rekombinantni kromosomi koji su odgovorni za veliki broj spontanih pobačaja. Sva *de-novo* strukturna razmještanja uglavnom su očinskog porijekla, osim iznimke Robertsonove translokacije koja je 65 % majčinskog porijekla (10). Translokacije utječu na sam proces spermatogeneze: pokazalo se da Robertsonova translokacija interferira s XY bivalentom stvarajući trivalent koji vodi abnormalnoj mejotičkoj diobi i posljedično prekidu razvoja spermija (31). Spontana *de-novo* strukturna razmještanja vjerojatno nastaju u spermijima ili spermatogonijima, gdje mehanizmi popravka DNA nisu potpuno funkcionalni (10).

Robertsonove translokacije i recipročne translokacije pojavljuju se 4 – 10 puta češće od drugih strukturnih poremećaja (20). U više od 50 % slučajeva Robertsonove translokacije pojavljuju se kod azoospermija ili teškog oblika oligozoospermije. Pojam Robertsonova translokacija označava spajanje dvaju nehomolognih ili homolognih akrocentričnih kromosoma, pri čemu dolazi do spajanja dvaju dugih krakova kromosoma međusobno. Također se i dva kratka kraka kromosoma spajaju, ali se često izgube prilikom diobe stanica, odnoseći samo heterokromatinske segmente. Zbog toga dolazi do smanjenja broja kromosoma za jedan, ali ostaje ista količina funkcionalne DNA. Najčešći oblici Robertsonove translokacije su rob(13;14) i rob(14;21) (10), jer se Robertsonove translokacije događaju među akrocentričnim kromosomima 13, 14, 15, 21 i 22. Robertsonove translokacije mogu se dogoditi i među drugim kromosomima, ali su vrlo rijetke.

Recipročne translokacije označavaju u pravilu izmjenu genetskog materijala između nehomolognih kromosoma, najčešće između autosoma i mogu se javljati u balansiranom i nebalansiranom obliku. Nositelji recipročnih balansiranih translokacija imaju povećan rizik stvaranja gameta s nebalansiranim kromosomskim translokacijama. Recipročne translokacije nastaju u pravilu kada se odlome dva kromosomska segmenta nehomologa i zamijene mjesta. Imamo različite oblike poremećaja razdvajanja kod translokacija: susjedne 1 i 2 (engl. *adjacent 1, adjacent 2*) te alternativne segregacije. U alternativnoj segregaciji nastaju gamete nositelji balansirane translokacije ili gamete s normalnim setom kromosoma jer oba translocirana kromosoma idu u jednu stanicu kćer, a oba normalna kromosoma idu u drugu stanicu kćer (32). Kod susjedne 1 ili 2 segregacije nastaju stanice kćeri s jednim normalnim i jednim translociranim kromosomom. Kod susjedne 1 segregacije, susjedne homologne centromere idu prema istom polu diobenog vretena te kao produkt imamo kromosomski abnormalne gamete koje sadrže jedan normalni i jedan translocirani kromosom koji ima istovremeno višak jednog segmenta (parcijalna trisomija) i nedostatak drugog translociranog kromosomskog segmenta (parcijalna monosomija). Susjedna 2 segregacija je odlazak susjednih homolognih centromera prema suprotnim polovima diobenog vretena, gdje se dobije parcijalna trisomija recipročne regije jednog kromosoma i parcijalna monosomija recipročne regije drugog kromosoma. Koliko je susjedna 1 segregacija česta pojava, toliko je susjedna 2 segregacija rijetka (33).

Inverzije označavaju promjenu redoslijeda gena, a nastaju nakon loma, rotacije otkinutog segmenta za  $180^\circ$  i ponovnog spajanja. One se ubrajaju u skupinu intrakromosomskih strukturnih aberacija jer kod inverzija dolazi do premještanja kromosomskih segmenata unutar jednog kromosoma. Paracentrične inverzije ne uključuju centromeru, dok je kod pericentričnih inverzija centromera uključena, te dolazi do rotacije odlomljenog kromosomskog segmenta za  $180^\circ$ . Iako su inverzije kod ljudi uglavnom neškodljive, njihov utjecaj na plodnost kod muškaraca ovisi o duljini inverzije i kromosoma na kojem je nastala inverzija. Smatra se da su paracentrične inverzije, kod kojih oblik kromosoma ostaje nepromijenjen, najčešće na kromosomima 1, 3, 5, 6, 7, 11 i 14 te da su češće na 6p, 7q, 11q i 14q krakovima (34). Incidencija paracentričnih inverzija nije utvrđena, ali neka istraživanja upućuju da se kreću u rasponu od 0,1 % – 0,5 % u općoj populaciji (35). Inverzijski heterozigot je nositelj jednog invertiranog, a drugog normalnog kromosoma koji se, u mejozi, sparuju uzdužno. Kako bi se omogućilo sparivanje regije gdje su kromosomi u obrnutom poretku, dolazi do stvaranja invertne petlje. Ako se *crossing-over* događa unutar petlje, dolazi

do stvaranja nebalansiranih kromosomskih abnormalnosti, kao što su delecije i duplikacije (32). Takvi produkti nazivaju se rekombinantni kromosomi i te rekombinacije mogu biti letalne, te rezultirati spontanom pobačajem ili rađanjem kromosomski bolesnog djeteta.

## **2. HIPOTEZA**

Različiti tipovi kromosomskih abnormalnosti, koji nastaju kao posljedica izlaganja rizičnim čimbenicima imaju važnu ulogu u poremećajima razvojnih mehanizama spermatogeneze koji dovode do nastanka neopstruktivne azoospermije i teškog oblika oligozoospermije.



### 3. CILJEVI

Ciljevi istraživanja su citogenetičkom analizom utvrditi:

- mogući uzrok nastanka neopstruktivne azoospermije i teškog oblika oligozoospermije;
- učestalost pojavljivanja i tip kromosomskih abnormalnosti u muškaraca s neopstruktivnom azoospermijom i teškim oblikom oligozoospermije;
- moguću povezanost postojanja kromosomskih abnormalnosti s defektnom spermatogenezom.

## 4. MATERIJALI I METODE

### 4.1. Ustroj istraživanja

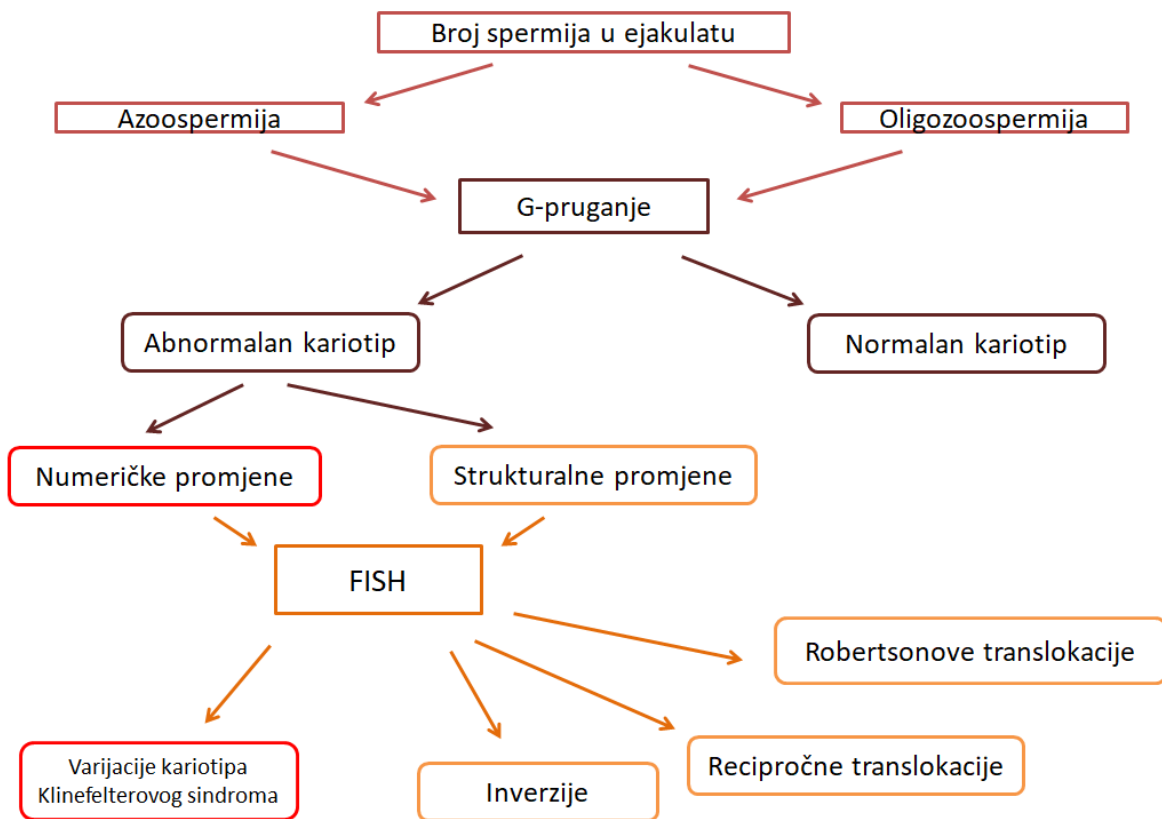
Istraživanje je provedeno kao retrospektivno-prospektivna studija (36).

Najvažniji je ključni kriterij broj spermija u analizi sjemene tekućine jer on najviše utječe na učestalost pojavnosti genetičkih poremećaja. Kao isključni kriterij postavljeni su opstruktivni i endokrini uzroci azospermije i oligozoospermije, izloženost radijaciji i otrovnim kemikalijama, ranije preboljene varicele ili neka druga bolest koja utječe na spermatogenezu, neplodnost sekundarnog uzroka, testikularna malignost, orhidektomija te ranije utvrđeno postojanje Y-kromosomske mikrodelecije kao uzročnika azospermije ili teškog oblika oligozoospermije ili uzimanje lijekova koji značajno utječu na funkcionalnu spermatogenezu.

### 4.2. Ispitanici

U istraživanje je uključeno 50 pacijenata s neopstruktivnom azospermijom i 50 pacijenata s oligozoospermijom. Analizirani su uzorci periferne krvi ukupno 100 ispitanika rutinskom citogenetičkom analizom. Prije obrade svaki je ispitanik imao fizikalni i androloški pregled koji uključuje detaljnu obiteljsku i osobnu povijest bolesti, hormonski status, testikularnu ultrasonografiju i analizu sjemene tekućine te je morao priložiti dokumentaciju reproduktivne povijesti partnerice. Za ovu studiju ispitanici su svrstani u dvije skupine na temelju rezultata spermioograma i vrijednostima FSH: neopstruktivna azospermija kao jedna grupa i teški oblik oligozoospermije kao druga grupa, koja je definirana kao broj spermija manji od  $5 \times 10^6$  po mL sjemene tekućine. Analiza sjemene tekućine provela se prema smjernicama Svjetske zdravstvene organizacije, uzorci su dostavljeni na sobnoj temperaturi u laboratorij i analiza je napravljena za broj spermija, volumen spermija, pH, motilitet i morfologiju (6), a dijagnoza azospermije i oligozoospermije potvrđena je ponavljanjem spermioograma u razmaku od najmanje mjesec dana. Kao što je prikazano na Slici 2, rezultati analize sjemene tekućine određuju daljnji tijek obrade uzorka.

### 4.3. Prikaz metoda



Slika 2. Shematski prikaz postupnika dijagnostičkih postupaka citogenetičke obrade muške neplodnosti.

#### 4.3.1. Prometafazna tehnika kultiviranja limfocita periferne krvi

Citogenetska je analiza najčešće korišten dijagnostički test za evaluaciju pacijenata s azoospermijom (20). Analiza broja i strukture kromosoma napravljeni su na 72-satnoj kulturi limfocita iz periferne krvi koristeći standardnu tehniku prometafaznih kromosoma s G-pruganjem te je analizirano najmanje 20 metafaza po ispitaniku, a kod sumnji na mozaicizam i do 100 metafaza.

Reagensi korišteni u procesu kultivacije:

- Hranilište: kompletni medij za kultivaciju (GIBCO PB-MAX Karyotyping medium, kat. br. 12557013)
- Otopine za sinkronizaciju stanične kulture (otopine A i B, Euroclone Synchrose, EKAMTS008)
- Kolcemid (GIBCO KaryoMAX COLCEMID (10 µg/mL), kat.br. 15212-012)
- Hipotonična otopina: 0,07 M otopina kalijevog klorida
- Fiksativ: metanol (Merck) i octena kiselina (Merck) u omjeru 3 : 1
- Octena kiselina (Merck)
- Destilirana voda

Uzorak periferne krvi uzima se u epruvetu s Na-heparinom te se u 5 mL hranilišta dodaje 0,5 mL pune krvi (otprilike 12 kapi). Kultivacija se radi u epruveti s plosnatim dnom koje se protrese i ostavi da se inkubira 72 sata na 37 °C. Nakon 48 h inkubacije kultiviranim stanicama dodaje se 100 µL otopine „A“ za sinkronizaciju koja sadrži FudR (5-flouoro-2'-deoxyuridine) te se epruveta zamota u aluminijsku foliju i ostavi preko noći. Nakon 17 h kultiviranim stanicama dodaje se 100 µL timidina (otopine „B“), nakon čega ih se ostavlja još 4 h na 37 °C. Nakon 72 h kultivacije stanice se tretiraju s tubulinskim inhibitorom (Kolcemid) da se zaustave u prometafazi tako da im se zaustavlja formiranje diobenog vretena te stoje još 30 min u inkubatoru na 37 °C. Potom slijedi centrifugiranje 5 min na 2000 o/min i odvajanje supernatanta. Nakon prvog odvajanja supernatanta dodaje se 4 – 5 mL tople hipotonične otopine, zatim se stanice opet inkubiraju na 37 °C 30 min. Potom slijedi centrifugiranje, zatim odvajanje supernatanta te dodavanje 2 mL fiksativa, pa treći put centrifugiranje. Nakon toga stanice se isperu u 2 mL fiksativa još dva puta, a potom u čistoj octenoj kiselini. Talog se nakaplje (5 – 6 kapi) na ranije ohlađena predmetna stakalca natopljena destiliranom vodom i ona se ostave da se osuše nad vodenom kupelji. Kada se osuše, stakalca se stavljaju 30 min u sterilizator na 100 °C.

### 4.3.2. G-pruganje

G-pruganje je citogenetička tehnika korištena za bojanje kondenziranih kromosoma nakon djelovanja proteolitičkog enzima tripsina kako bi se dobile karakteristične pruge.

Temelji se na bojanju kromosoma u svjetlije i tamnije pruge ovisno o strukturi i raspodjeli kromatina. Heterokromatinske regije, koje su bogatije adeninom i timinom, imat će veću tendenciju prikupljanja boje na sebe zbog jače kondenziranog kromatina, te će biti tamnije obojene. Suprotno tome, regije bogatije genima, odnosno gvaninom i citozinom imaju kromatin slabije kondenziran zbog čega su svjetlije obojene. Svaki kromosom ima specifičan uzorak pruga, što omogućava usporedbu homolognih kromosoma.

Reagensi korišteni u procesu G-pruganja:

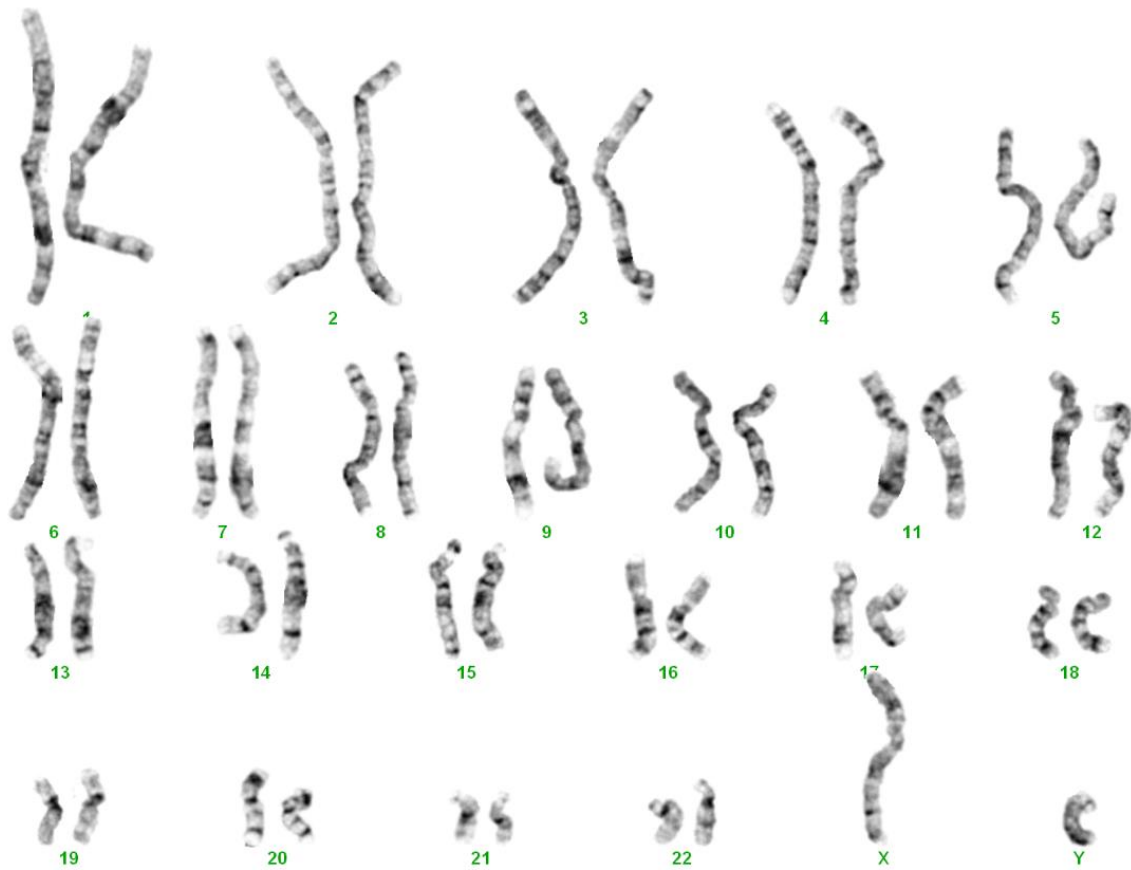
- Tripsin (GIBCO, 0,25 % Trypsin (1X), kat.br. 25050-014), hladan, čuvan na 4 °C
- Ringerova otopina (Braun)
- Fosfatni pufer (GIBCO - Buffer Tablets „GURR“, kat.br. 10582-013)
- GIEMSA boja (Merck)
- Destilirana voda

Redoslijed bojanja:

1. kadica: 0,25 % Trypsin
2. kadica: Ringerova otopina
3. kadica: 160 mL fosfatnog pufera i 40 mL Giemsa boje
4. kadica: fosfatni pufer
5. kadica: destilirana voda

Preparat se stavi u tripsin i drži 2 – 10 sekundi kako bi tripsin djelomično digestirao metafazne kromosome. Nakon tretmana tripsinom preparat se ispere Ringerovom otopinom te stavlja u Giemsa boju šest minuta. Na kraju se preparat ispere u fosfatnom puferu te destiliranoj vodi i ostavi na zraku da se osuši.

G-pruganje temelji se na različitom intenzitetu bojanja regija kromosoma, kao što je prikazano na Slici 3. On obuhvaća svaki krak kromosoma od centromere do telomere i omogućava da svaka pruga na kromosomu bude identificirana i precizno opisana. Preparati se gledaju pod svjetlosnim mikroskopom i rezultati se zapisuju u obliku formule 46,XX(Y), ako su normalni. Numeričke i strukturne abnormalnosti navode se prema ISCN sustavu (2016).



Slika 3. Prikaz normalnog muškog kariotipa (46,XY) nakon G-pruganja.

#### 4.3.3. Fluorescentna *in situ* hibridizacija (FISH)

Fluorescentna *in situ* hibridizacija (FISH) koristi se za identifikaciju *de novo* strukturnih promjena, analizu mjesta loma na strukturnim razmještanjima i evaluaciju kromosomskih mozaicizama. To je citogenetička tehnika koja se temelji na principu interakcije fluorescentno obilježene DNA sonde s komplementarnom ciljnom DNA sekvencom te tako omogućava identifikaciju i lokalizaciju specifičnih DNA sekvenci koje su prisutne ili odsutne na određenom kromosomu.

FISH je metoda izbora u određivanju mozaicizama spolnih kromosoma, s obzirom na to da omogućuje analizu velikog broja stanica te za razliku od klasične kromosomske analize omogućuje i analizu interfaznih jezgara.

FISH se provodi prema uputama proizvođača fluorescencijskih sonda na preparatima pripremljenima prilikom obrade različitih humanih uzoraka. Stanična suspenzija nakapa se na

mokra predmetna stakalca koja se do obrade čuvaju na  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  ili se odmah obrađuju. Priprema preparata za FISH sastoji se od predtretmana, denaturacije, hibridizacije, post-hibridizacijske obrade i bojanja.

Reagensi potrebni za pripremu uzorka:

- 70 % octena kiselina (u dH<sub>0</sub>)
- 1 x PBS, pH = 7,4 (Invitrogen)
- 70 % etanol, 85 % etanol, 100 % etanol
- Komercijalne FISH sonde (Leica Biosystems)
- Wash Buffer I: otopina 0,4 x SSC/0,3% Tween 20 (Tween 20, 10 %-tna vodena otopina, Merck)
- Wash Buffer II: otopina 2 x SSC/0,1 % Tween (Tween 20, 10 %-tna vodena otopina, Merck)
- Otopina 2 x SSC (20 x otopina SSC, Sigma)
- DAPI boja (DAPI/Antifade solution, 0,1  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , Leica Biosystems)

Predtretman:

1. Osušiti stakalca na sobnoj temperaturi.
2. Stakalca se stave u svježe pripremljenu 70 %-tnu octenu kiselinu jednu minutu na sobnoj temperaturi.
3. Stakalca se stave u fosfatni pufer (1 x PBS, pH = 7,4), inkubiraju se 30 sekundi na sobnoj temperaturi.
4. Ponovno se isperu u 1 x PBS-u inkubacijom na sobnoj temperaturi tijekom 5 minuta.
5. Preparati se dehidriraju uranjanjem u seriju etanola rastuće koncentracije (70 %, 85 % i 100 %), po jednu minutu u svakoj koncentraciji.
6. Ostaviti stakalca da se osuše na sobnoj temperaturi.

Priprema i nanošenje sonde:

U istraživanju su korištene komercijalne FISH sonde koje su direktno obilježene fluorokromima. Prema uputama proizvođača sonde se zagriju na sobnu temperaturu, zatim se prije uporabe lagano centrifugiraju, vorteksiraju i ponovno centrifugiraju.

1. 10  $\mu\text{L}$  sonde ili smjese sondi nanijeti na predmetno stakalce s uzorkom.

2. Prekriti preparat sa staklenom pokrovnicom i učvrstiti tekućim ljepilom.

Postupak denaturacije i hibridizacije:

1. Denaturacija uzorka i sonde provodi se istovremeno u uređaju za hibridizaciju (*Thermobrite*, Leica Biosystems) tijekom 5 minuta na 75 °C.
2. Hibridizacija uzorka i sonde provodi se tijekom 24 – 72 h na 37 °C u vlažnim uvjetima u uređaju za hibridizaciju (*Thermobrite*).

Ispiranje uzorka nakon postupka hibridizacije:

1. Zagrijati otopine za ispiranje Wash Buffer I i II na 72 °C, najmanje 1 h.
2. S preparata ukloniti pokrovnicu i ljepilo.
3. Preparate 2 minute ispirati u prethodno zagrijanoj otopini 0,4 x SSC/0,3 % Tween 20.
4. Ispirati preparate u otopini 2 x SSC/0,1 % Tween tijekom 1 minute.
5. Preparati se kratko ohlade u otopini 2 x SSC
6. Dehidrirati stakalca u 70 %, 85 % i 100 % etanolu, 1 minutu u svakoj koncentraciji i pustiti da se osuše na zraku.

Bojanje uzoraka:

Kada se stakalca osuše na sobnoj temperaturi, na njih se stavlja 10 µL otopine fluorescencijske boje DAPI (DAPI/Antifade otopina) te se preko uzorka s bojom stavlja pokrovnica. Stakalca je potrebno ostaviti na suhom i mračnom mjestu 10 – 15 minuta kako bi se boja razvila. Nakon toga uzorak se mikroskopira. Preparati se analiziraju fluorescencijskim mikroskopom povezanim sa softverskim sustavom Isis Fluorescence Imaging System (MetaSystems).



#### 4.4. Statističke metode

Numeričke vrijednosti prikazane su aritmetičkom sredinom, standardnom devijacijom, medijanom i granicama interkvartilnog raspona, a za predstavljanje kategorijskih podataka korištene su tablice apsolutnih i relativnih frekvencija i t-test, da se usporede frekvencije kromosomopatija među skupinama. Hi-kvadrat test upotrebljen je za razliku kategorijskih varijabli, a Shapiro – Wilkov test za provjeru normalnosti raspodjele numeričkih varijabli. Za određivanje mjere pouzdanosti između metoda korištena je Bland – Altmanova analiza kojom je definirana srednja vrijednost razlika mjerenja i stvorene su granice pouzdanosti. Statistički značajnima smatraju se sve P vrijednosti od 0,05 ili manje. Za statističku analizu korišten je statistički program MedCalc Software version 17.8.2. (MedCalc Software bvb, Ostend, Belgium; <http://medcalc.org>; 2017).

## 5. REZULTATI

U ovom istraživanju obrađeno je 100 uzoraka za citogenetičku analizu, od toga 50 uzoraka pacijenata s azoospermijom i 50 uzoraka pacijenata s teškim oblikom oligozoospermije. Aritmetička sredina dobi ispitanika s neopstruktivnom azoospermijom iznosila je 36 godina, sa standardnom devijacijom od 5 godina. U skupini ispitanika s teškim oblikom oligozoospermije aritmetička sredina dobi ispitanika iznosila je 37 godina, sa standardnom devijacijom od 5 godina. Nije uočena značajna razlika između ispitivanih skupina (Studentov t-test,  $P = 0,85$ ). Ispitivane skupine nisu se značajno razlikovale ni u ostalim obilježjima (Tablica 1).

Tablica 1. Klinički podatci ispitanika

|                               | Broj (%) ispitanika    |   | $P^*$  |
|-------------------------------|------------------------|---|--------|
|                               | Azoospermija<br>N = 50 | Teški oblik<br>oligozoospermije<br>N = 50 |        |
| Komorbiditet‡                 | 0                      | 3 (6)                                     | 0,0802 |
| Bolesti majke                 | 8 (16)                 | 10 (20)                                   | 0,6045 |
| Reproduktivna anamneza majke† |                        |   |        |
| 1 SP                          | 1 (2)                  | 4 (8)                                     | 0,32   |
| 2 SP                          | 1 (2)                  | 0   |        |
| 3 SP                          | 1 (2)                  | 0   |        |
| > 3SP                         | 0                      | 1 (2)                                     |        |
| Dijete umrlo pri porodu       | 0                      | 1 (2)                                     |        |

\*  $\chi^2$ -test

‡ Komorbiditet označava dodatna oboljenja pacijenta koja mogu biti neizravno povezana s njegovom reproduktivnom sposobnosti, a od bolesti majke navodimo kronične i maligne bolesti.

† SP - spontani pobačaji.

Niti jedan pacijent iz skupine azospermije nije imao komorbiditet u odnosu na tri pacijenta skupine oligozoospermije, što nije bilo statistički značajno ( $\chi^2 = 3,062$ ,  $DF = 1$ ,  $P = 0,0802$ ). U skupini oligozoospermičnih muškaraca jedan je pacijent imao agenezu lijevog bubrega, jedan dijabetes, a jedan pacijent epilepsiju. Osam (16 %) pacijenata iz skupine muškaraca s azospermijom ima pozitivnu majčinu anamnezu na spontane pobačaje, dok je u skupini oligozoospermije deset (20 %) pacijenata imalo majku s pozitivnom anamnezom na jedan ili više spontanih pobačaja. Navedena razlika između skupina nije bila statistički značajna ( $\chi^2 = 0,268$ ,  $DF = 1$ ,  $P = 0,6045$ ). U skupini azospermije majke su imale sljedeće bolesti: dva slučaja malignih oboljenja, tri slučaja dijabetesa te po jedan slučaj kardiovaskularne bolesti, moždanog udara i bolesti štitnjače. U skupini oligozoospermije kod majki pacijenata zabilježene su sljedeće bolesti: tri maligna oboljenja, tri slučaja kardiovaskularne bolesti, dva dijabetesa te po jedna autoimuna bolest (reumatoidni artritis) i bolest štitnjače. Nije bilo statistički značajne razlike između ispitivanih skupina u broju spontanih pobačaja ili broju djece umrle pri porodu majke ( $\chi^2 = 5,899$ ,  $DF = 5$ ,  $P = 0,3162$ ).

Samo je jedan pacijent iz skupine azospermije konzumirao alkohol, pri čemu je način konzumacije naveo kao povremeno, te ga zbog toga nismo isključili iz istraživanja. Izloženost toksinima i pušenje također su bili isključni kriteriji, ali niti jedan od pacijenata nije bio izložen nekom od gore navedenih štetnih čimbenika. U Tablici 2 prikazani su rezultati citogenetičke analize u objema ispitivanim skupinama.

Tablica 2. Rezultati citogenetičke analize

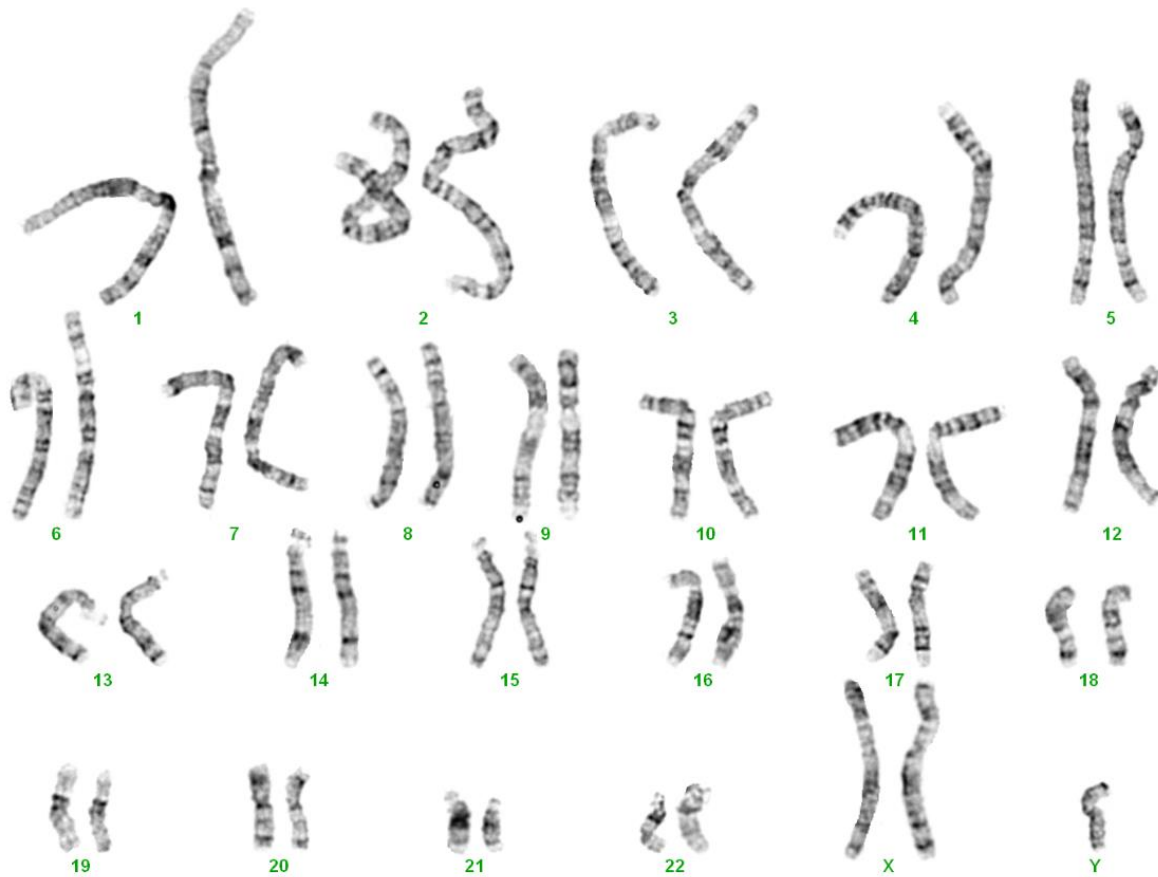
|   | Broj (%) ispitanika    |                            | <i>P</i> * |
|---|------------------------|----------------------------|------------|
|   | Azoospermija<br>N = 50 | Oligozoospermija<br>N = 50 |            |
| Normalan kariotip   | 42 (84)                | 49 (98)                    |            |
| Numerička abnormalnost spolnih kromosoma                    | 6 (12)                 | 0                          |            |
| Strukturna razmještanja između autosoma i spolnih kromosoma | 1 (2)                  | 0                          | 0,0300     |
| Strukturna razmještanja autosoma                            | 1 (2)                  | 1 (2)                      |            |
| Ukupan broj kromosomski abnormalnih                         | 8 (16)                 | 1 (2)                      |            |

\*  $\chi^2$ -test

Rezultati su prikazani kao apsolutni brojevi s postotcima.

Ukupna pojavnost različitih tipova kromosomskih abnormalnosti u objma ispitivanim skupinama iznosi 9 %. Statistički značajno veći broj kromosomskih abnormalnosti zabilježen je kod pacijenata u skupini azoospermije u odnosu na skupinu oligozoospermije ( $\chi^2 = 10,711$ ,  $DF = 4$ ,  $P = 0,0300$ ). U skupini neopstruktivne azoospermije otkriveno je ukupno 16 %, a u skupini teškog oblika oligozoospermije 2 % kromosomskih abnormalnosti.

U skupini azoospermije bilo je šest slučajeva Klinefelterovog sindroma (47,XXY, Slika 4), dok u skupini oligozoospermije nije zabilježen nijedan slučaj aneuploidije spolnih kromosoma. Udio numeričkih abnormalnosti u skupini neopstruktivne azoospermije iznosio je 12 % (6/50).



Slika 4. Prikaz kariotipa Klinefelterovog sindroma (47,XXY).

U skupini azoospermije otkriven je jedan slučaj nebalansirane translokacije između autosoma i spolnog kromosoma i to kromosoma 14 i Y kromosoma [(45,X,der(Y)t(Y;14)(q11.2;p12), Slika 5], dok u skupini oligozoospermije nije zabilježen nijedan slučaj. U ovom slučaju lom se dogodio uzvodno od AZF regija (a, b i c), te je došlo do njihovog gubitka. Kako dio deletiranog Y (Yq11.2-qter) kromosoma nosi izuzetno važne gene za mušku spermatogenezu, to nam objašnjava podrijetlo azoospermije kod ovog pacijenta. Delecija kratkog kraka 14. kromosoma nema kliničku važnost jer su to heterokromatinski kromosomski segmenti.

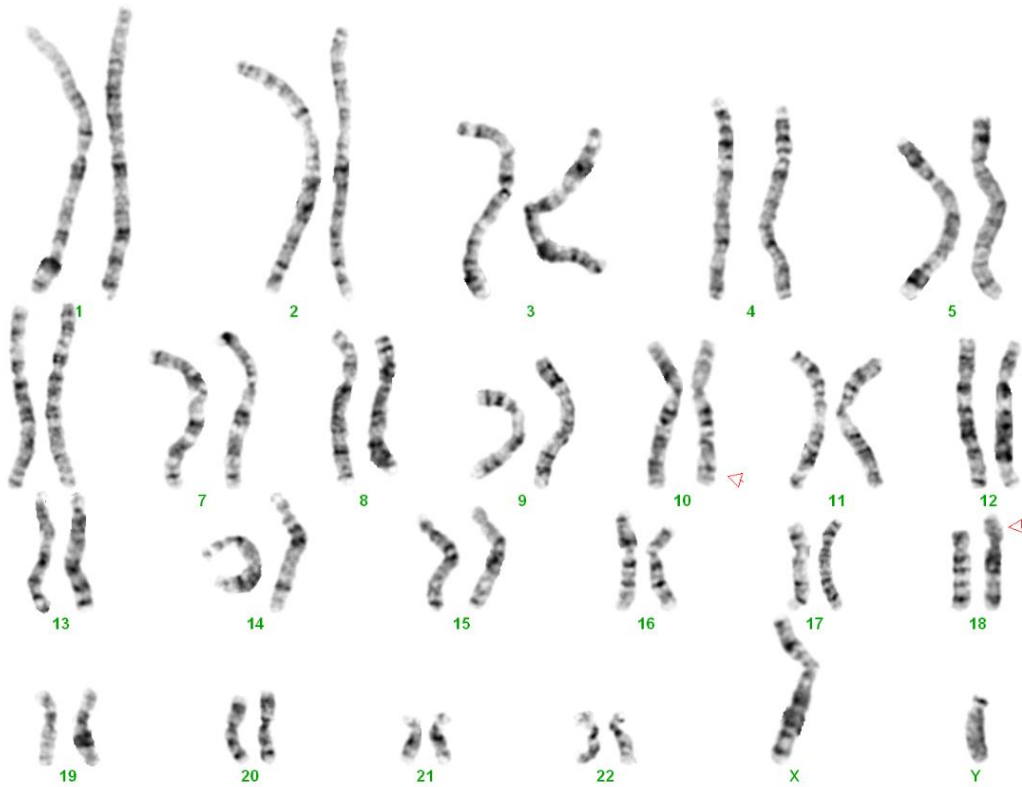


Slika 5. Prikaz nebalansirane translokacije između 14. kromosoma i Y kromosoma ( $45,X,der(Y)t(Y;14)(q11.2;p12)$ ).

Jedna strukturna abnormalnost autosoma zabilježena je u skupini oligozoospermije i to Robertsonova translokacija ( $45,XY,der(14;21)(q10;q10)$ , Slika 6.), dok je u skupini azoospermije bila jedna balansirana recipročna translokacija između dugog kraka kromosoma 10 i kratkog kraka kromosoma 18 ( $46,XY,t(10;18)(q25.3;p11.23)$ , Slike 7., 8., 9. i 10.).



Slika 6. Prikaz Robertsonove translokacije (45,XY,der(14;21)(q10;q10)).

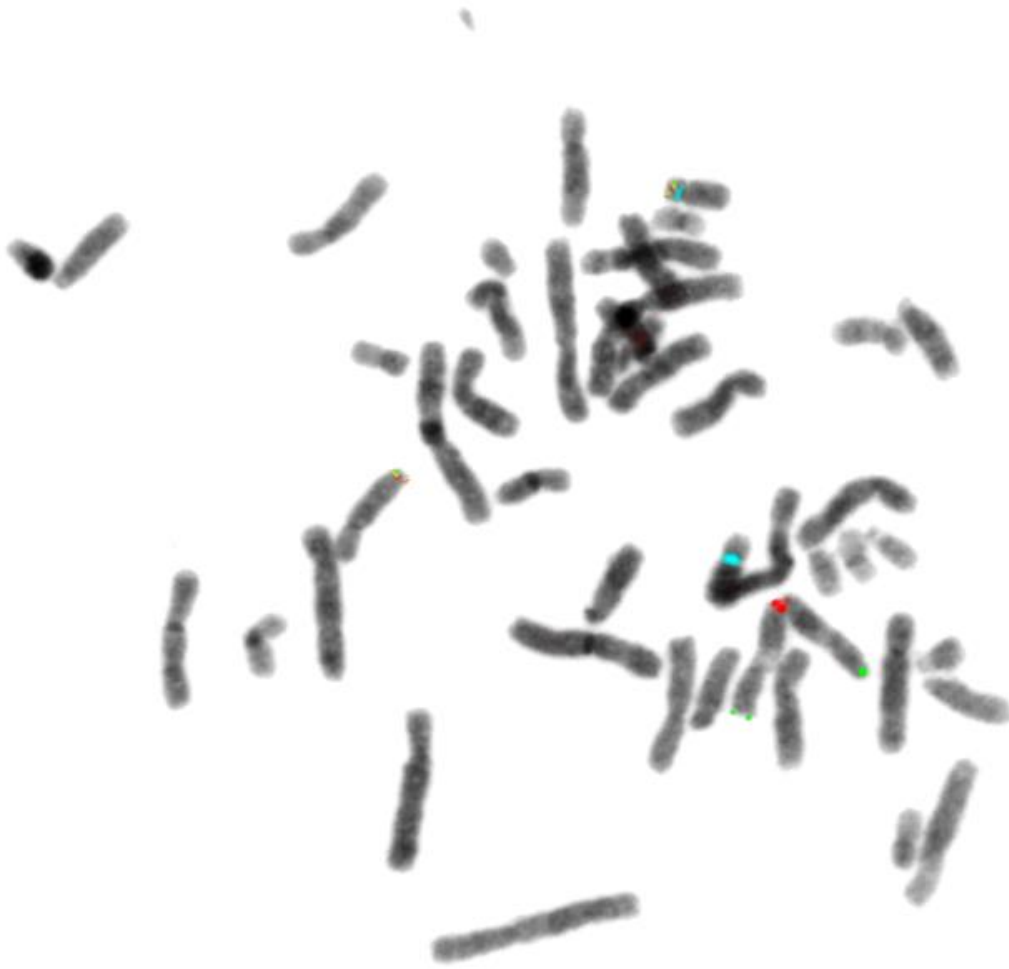


Slika 7. Prikaz recipročne translokacije između autosomnih kromosoma 10 i 18 (46,XY,t(10;18)(q25.3;p11.23)).

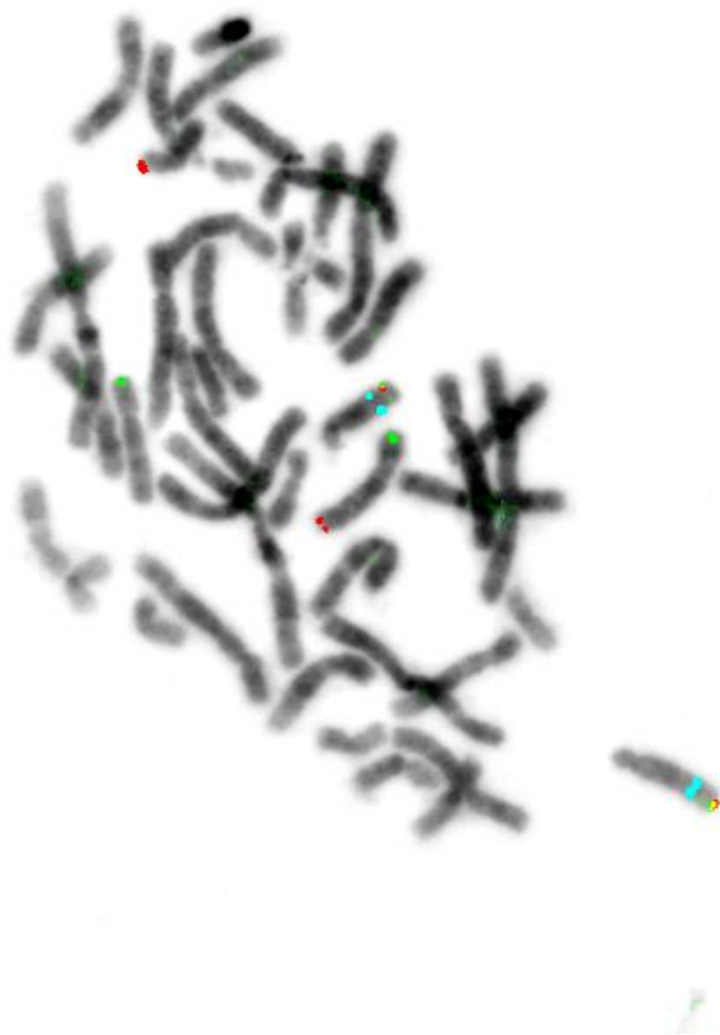


Slika 8. Prikaz recipročne translokacije između autosomnih kromosoma 10 i 18 (46,XY,t(10;18)(q25.3;p11.23)) FISH metodom koristeći sonde koje boje čitave krakove kromosoma. Crveno obojeni dijelovi kromosoma – sonda koja boji čitav q krak kromosoma 18; zeleno obojeni dijelovi kromosoma – sonda koja boji čitav p krak kromosoma 10.





Slika 9. Prikaz recipročne translokacije između autosomnih kromosoma 10 i 18 (46,XY,t(10;18)(q25.3;p11.23)) FISH metodom koristeći subtelomerne sonde. Korištene su sonde: subtelomera 18p (crveno + zeleno obojeno), subtelomera 11p (zeleno obojeno), subtelomera 11q (crveno obojeno); u mješavini sonde nalazi se i centromera 18 (D18Z1) (aqua obojeno).



Slika 10. Prikaz recipročne translokacije između autosomnih kromosoma 10 i 18 (46,XY,t(10;18)(q25.3;p11.23)) FISH metodom koristeći subtelomerne sonde. Korištene su sonde: subtelomera 10p (zeleno obojeno), subtelomera 10q (crveno obojeni), subtelomera 15q (crveno + zeleno obojeno); u mješavini sondi nalazi se i LSI 15q22 (aqua obojeno).

FISH analizom detektirana su kromosomska razmještanja vezanjem fluorescentno obilježene DNA sonde s komplementarnom ciljnom DNA sekvencom. Na Slici 8 se vidi da je dio kraćeg kraka kromosoma 18 translociran na dugi krak 10. kromosoma, budući da su sondama obojani dugi (q) i kratki (p) krak kromosoma 18 u zeleno (p krakovi) i crveno (q krakovi). Ista translokacija prikazana je na Slici 9 uz pomoć subtelomernih sonda. Miks koji je korišten sadržavao je subtelomerne sonde za kromosom 11 (11p i 11q), za 18p i centromeru kromosoma 18. Tu se vidi da je jedna centromera kromosoma 18 (aqua boja) i subtelomera 18p (crveno + zeleno) na jednom kromosomu, dok su druga subtelomera 18p i centromera kromosoma 18 na dva različita kromosoma, iz čega se također zaključuje da je translociran

terminalni dio kratkog kraka 18. kromosoma. Slika 10 prikazuje, subtelnim sondama 10p i 10q, translokaciju dugog (q) kraka kromosoma 10, obojenog u crveno. Prema tome je zaključeno da je u pitanju recipročna translokacija između kromosoma 10q i 18p.

Pericentrična inverzija 9p11q13 ili 9p12q13, prikazana na Slici 11, strukturna je varijanta koja je zabilježena kod dva pacijenta (4 %) u skupini s teškim oblikom oligozoospermije. Ona predstavlja normalnu kromosomsku varijantu, ali ne može u potpunosti isključiti njihov patogeni učinak na pravilnu segregaciju kromosoma.



Slika 11. Prikaz muškog kariotipa s pericentričnom inverzijom 9. kromosoma.

## 6. RASPRAVA

Istraživanje je provedeno na Odjelu za laboratorijsku citogenetiku Kliničke bolnice „Sveti Duh“ s ciljem određivanja pojavnosti citogenetičkih abnormalnosti kod muškaraca s neopstruktivnom azospermijom i teškim oblikom oligozoospermije. Ustanovljeno je da je ukupna pojavnost različitih tipova kromosomskih abnormalnosti u obje ispitivane skupine 9 %. U skupini neopstruktivne azospermije postotak je nešto viši i iznosi 16 % u odnosu na 2 % u skupini teškog oblika oligozoospermije. Uspoređujući pojavnost određenih tipova kromosomskih poremećaja u obje ispitivane skupine, strukturna razmještanja između spolnih kromosoma i autosoma, otkrivena su u 2 % pacijenata u skupini azospermije, dok u skupini oligozoospermije nije otkriven niti jedan slučaj. U skupini oligozoospermije pronađen je jedan pacijent s Robertsonovom translokacijom 14;21 u pojavnosti od 2 %, dok u skupini azospermije jedan pacijent (2 %) ima recipročnu translokaciju između kromosoma 10 i 18. Što se tiče numeričkih abnormalnosti spolnih kromosoma, zabilježeni su samo u skupini neopstruktivne azospermije i to u pojavnosti od 12 %.

Istraživanje Kosar i suradnika (39) pokazalo je da su svi slučajevi kromosomskih abnormalnosti bili vezani uz neopstruktivnu azospermiju, dok kromosomske abnormalnosti nisu dokazane kod slučajeva teškog oblika oligozoospermije. Rezultati dobiveni u istraživanju provedenom u Kliničkoj bolnici „Sveti Duh“ pokazali su značajno veći broj kromosomskih abnormalnosti poremećaja u skupini azospermije u odnosu na skupinu s teškim oblikom oligozoospermije. U istraživanju Ghorbel i suradnika (23), ispitivane skupine imale su 76 ispitanika (54 ispitanika u skupini azospermije te 22 ispitanika u skupini oligozoospermije) u odnosu na 100 ispitanika u našem istraživanju (50 ispitanika u svakoj skupini). Retrospektivnom analizom zaključeno je da je pojavnost kromosomskih abnormalnosti 22,2 % kod slučajeva neopstruktivne azospermije, u odnosu na 16 % u našem istraživanju i 13,6 % kod muškaraca s teškim oblikom oligozoospermije, u odnosu na 2 % u istoj skupini u našem istraživanju. Istraživanje Pylyp i suradnika (2) pokazalo je pojavnost 35 % u skupini od 40 pacijenata s neopstruktivnom azospermijom i 12,8 % kod 164 ispitanika u skupini teškog oblika oligozoospermije. U oba istraživanja uočava se značajnu veću pojavnost kromosomskih abnormalnosti kod neopstruktivne azospermije u odnosu na skupinu teškog oblika oligozoospermije, kao i u našem istraživanju. Također, u istraživanju

Fu i suradnika (40) skupina neopstruktivne azoospermije uključivala je 945 pacijenata, a skupina teškog oblika oligozoospermije 388 pacijenata. Rezultati se vrlo malo razlikuju od rezultata dobivenih u našem istraživanju, pokazujući da je pojavnost kromosomskih abnormalnosti kod pacijenata s azoospermijom 14,71 %, a kod pacijenata s teškim oblikom oligozoospermije 3,87 %. Moguće da su različiti kriteriji uključivanja pacijenata i broj pacijenata istraživanih skupina doveli do varijacija rezultata.

Kim i suradnici (6), pokazali su ukupnu pojavnost kromosomskih abnormalnosti od 16,93 % (204 od 1,205 ispitivanih pacijenata), za što autori smatraju da je u skladu s prethodno objavljivanim studijama. Prema tome, dobivena ukupna pojavnost kromosomskih abnormalnosti od 9 % u istraživanju provedenom u Kliničkoj bolnici „Sveti Duh“ je u okviru rezultata prethodno objavljivanih studija. U istraživanju Hamada i suradnika (20) pretpostavlja se da genetički čimbenici mogu objasniti 21 – 29 % slučajeva azoospermije, dok je 12 – 41 % slučajeva azoospermije ostaje nepoznatog podrijetla. Budući da u našem istraživanju pojavnost kromosomskih abnormalnosti u skupini neopstruktivne azoospermije iznosi 16 %, možemo zaključiti da se rezultati slažu s pretpostavkom istraživanja Hamada i suradnika.

U općoj populaciji, Klinefelterov sindrom najčešća je abnormalnost spolnih kromosoma, s pojavnošću od 0,11 % (31). Istraživanje Alhalabi i suradnika (29) prikazuje pojavnost od 20,91 % Klinefelterovog sindroma i njegovih kromosomskih varijanti u skupini neopstruktivne azoospermije na 880 ispitanih pacijenata, što je više od 12 % u našem istraživanju. U istraživanju Hofherr i suradnika (31) 14 % ispitanika imalo je abnormalan kariotip, a 90 % od toga su bili ispitanici s kariotipom 47,XXY ili nekom mozaičnom varijantom Klinefelterovog sindroma. U našem istraživanju 12 % ispitanika imalo je kariotip 47,XXY, bez mozaičnih varijanti. Istraživanje Krauzs i suradnika (14) navodi da su Klinefelterov sindrom (47,XXY) i njegov mozaični oblik (46,XY/47,XXY) najčešće kromosomske abnormalnosti u neopstruktivnoj azoospermiji, dok su strukturne autosomne abnormalnosti (translokacije i inverzije) češće kod muškaraca s oligozoospermijom. Što se tiče strukturnih razmještanja autosoma, najčešće su Robertsonove translokacije, inverzije i recipročne translokacije (14). Hamada i suradnici (20) zaključili su da je Robertsonova translokacija najčešći oblik strukturnog razmještanja autosoma te da je češća kod oligozoospermičnih i azoospermičnih muškaraca. Prema istraživanju Krauzs i suradnika (14) strukturne abnormalnosti autosoma su 4 – 8 % češće kod oligozoospermije nego kod normozoospermije. U našem istraživanju imali smo jedan slučaj strukturnih abnormalnosti

autosoma kod teškog oblika oligozoospermije, Robertsonovu translokaciju između akrocentričnih kromosoma 14 i 21 (45,XY,der(14;21)(q10;q10)), što čini 2 % ukupnog broja pacijenata. Pylyp i suradnici (2) opisuju Klinefelterov sindrom u čak 64 % pacijenata i 22 % balansiranih strukturnih razmještanja (dvije Robertsonove translokacije i jedna recipročna translokacija) od ukupnog broja pacijenata s abnormalnim kariotipom i neopstruktivnom azoospermijom, i 91 % autosomnih strukturnih abnormalnosti (dvije inverzije, sedam Robertsonovih translokacija i deset recipročnih translokacija) od ukupnog broja kromosomskih poremećaja u grupi oligozoospermije. U našem istraživanju smo utvrdili da je 75 % pacijenata iz skupine azoospermije od ukupnog broja njih s kromosomskim poremećajem imalo Klinefelterov sindrom, 12,5 % je imalo translokaciju autosomnih kromosoma (recipročna translokacija 10;18), a 12,5 % (jedan slučaj) strukturno razmještanje između autosoma i spolnog kromosoma. Robertsonova translokacija jedini je kromosomski poremećaj otkriven u skupini pacijenata s teškim oblikom oligozoospermije u našem istraživanju. Također smo u skupini teškog oblika oligozoospermije zabilježili dva slučaja (4 %) pericentrične inverzije 9. kromosoma koja se smatra normalnom kromosomskom varijantom u općoj populaciji.

U usporedbi s istraživanjem Hofherr i suradnika (31), gdje je kod 100 pacijenata, od ukupno 2,749 iz obje skupine, uočena mikrolelecija na Y kromosomu (4 %), mi smo deleciju kompletne AZF regije kao posljedicu translokacije imali kod jednog pacijenta (2 %) u azoospermičnoj skupini (45,X,der(Y)t(Y;14)(q11.2;p12)). AZF regije na Yq11.2 su jedna od najpolimorfnijih regija u ljudskom genomu, povezana s poteškoćama s plodnošću (37). Mikrolelecije AZFa regije inače su povezane sa sindromom samo Sertolijevih stanica, AZFb regije sa zastojem u sazrijevanju stanica u mejozi, dok se mikrolelecije na AZFc regiji povezuje s nekoliko različitih poremećaja: sindrom samo Sertolijevih stanica, potpuni zastoj sazrijevanja stanica u mejozi, redukcija broja zametnih stanica (hipospermatogeneza) te teški oblik oligozoospermije (38).

Iz navedenog se da zaključiti da se rezultati istraživanja provedenog na populaciji neplodnih muškaraca u Hrvatskoj ne razlikuju značajnije od rezultata istraživanja dobivenih u različitim međunarodnim studijama. Iako se može uočiti da je najčešći uzrok neopstruktivne azoospermije Klinefelterov sindrom, i druge genetičke uzroke neopstruktivne azoospermije i teškog oblika oligozoospermije moramo uzeti u obzir.

Varijacije u rezultatima drugih istraživanja i istraživanja provedenog u Kliničkoj bolnici „Sveti Duh“ mogu se objasniti različitom populacijskom podrijetlu subjekata te različitim kriterijima uključivanja, odnosno, isključivanja iz istraživanja. Ograničenje istraživanja je uporaba metode klasične citogenetičke analize pacijenata kojom se male strukturne promjene ne mogu uočiti zbog ograničenja u razlučivanju tehnologije, a mogu biti klinički iznimno značajne (41).

Nove genomske tehnologije korištene u istraživanju muške neplodnosti mogu se podijeliti u dvije skupine; one koje koriste tehnologiju mikročipova i one utemeljene na NGS pristupu (14). Mikročipovi se koriste za analizu ekspresije gena i varijacija broja kopija. Komparativna genomska hibridizacija (CGH) omogućava izravno pronalaženje promjena broja kopija u sekvenci temeljeno na intenzitetu hibridizacije testiranog uzorka u usporedbi s intenzitetom hibridizacije referentnog uzorka za određenu regiju. Sekvenciranje nove generacije (NGS) omogućava brzo i jeftino sekvenciranje cijelog genoma. Korištenje novih tehnika u istraživanju neplodnosti moglo bi pomoći u kreiranju cjelokupne slike gena koji uzrokuju neplodnost, razvoju ciljanih rješenja, te bi omogućilo poboljšanja u potpomognutoj oplodnji (20).

## 7. ZAKLJUČAK

Na temelju rezultata dobivenih provedenim istraživanjem, mogu se izvesti sljedeći zaključci:

- Oko 16 % uzroka neopstruktivne azoospermije i 2 % teškog oblika oligozoospermije čine kromosomski poremećaji.

- Utjecaj rizičnih čimbenika na nastanak neopstruktivne azoospermije i teškog oblika oligozoospermije nije utvrđen.

- Najčešći tip kromosomskih poremećaja koji se pojavljuje kod neopstruktivne azoospermije je Klinefelterov sindrom u pojavnosti od čak 75 % od ukupnog broja kromosomskih poremećaja u ovoj skupini.

- U ukupno 9 % pacijenata s neopstruktivnom azoospermijom i teškim oblikom oligozoospermije otkriven je neki kromosomski poremećaj, a oko 33 % kromosomskih poremećaja čine strukturne abnormalnosti spolnih kromosoma i/ili autosoma.



## 8. SAŽETAK

**Cilj istraživanja:** Utvrditi pojavnost i tipove kromosomskih poremećaja u skupini pacijenata s neopstruktivnom azoospermijom i teškim oblikom oligozoospermije s defektnom spermatogenezom, njihov tip i pojavnost te rezultate usporediti s postojećim rezultatima iz tog područja.

**Nacrt studije:** Retrospektivno-poredbena studija u kojoj se uspoređuju pojavnost i tip kromosomskih poremećaja između skupine oligozoospermičnih i azoospermičnih neplodnih muškaraca od 2012. do 2018. godine.

**Ispitanici i metode:** Ispitanici su uključivani u istraživanje na temelju rezultata analize sjemene tekućine, pri čemu su u grupu azoospermije svrstano 50 ispitanika koji nisu imali spermija u ejakulatu, dok su u skupinu oligozoospermije svrstano 50 ispitanika čiji je broj spermija/mL iznosio < 5 milijuna. Korištene su standardne citogenetičke metode koje se temelje na analizi preparata prometafaznih kromosoma dobivenih iz kratkotrajne stanične kulture limfocita periferne krvi. G-pruganje omogućuje prepoznavanje strukturnih i numeričkih poremećaja, a uz pomoć FISH metode analizirane su strukturne promjene i evaluirani kromosomski mozaicizmi.

**Rezultati:** Ukupna pojavnost kromosomskih abnormalnosti u obje skupine iznosi 9 %, dok pojavnost kromosomskih abnormalnosti kod neopstruktivne azoospermije iznosi 16 %, a kod teškog oblika oligozoospermije 2 %. U skupini neopstruktivne azoospermije kao najčešći oblik kromosomske abnormalnosti javlja se Klinefelterov sindrom (75 %), a u skupini teškog oblika oligozoospermije otkrivena su samo strukturna razmještanja autosoma.

**Zaključak:** Istraživanjem je utvrđeno da postoji statistički značajna razlika između pojavnosti kromosomskih abnormalnosti između skupine neopstruktivne azoospermije i teškog oblika oligozoospermije. Kromosomski poremećaji predstavljaju značajne uzroke muške neplodnosti. Rezultati istraživanja podudaraju s rezultatima ranije objavljenih studija.

**Ključne riječi:** neopstruktivna azoospermija, oligozoospermija, muška neplodnost, kromosomske abnormalnosti

## 9. SUMMARY

### CYTOGENETIC ABNORMALITIES IN MEN WITH NON-OBSTRUCTIVE AZOOSPERMIA AND SEVERE FORM OF OLIGOZOOSPERMIA

**Objectives:** The aim of this paper was to determine the incidence and type of chromosomal abnormalities in patients with non-obstructive azoospermia and severe oligozoospermia and analyze their correlation with defective spermatogenesis in infertile men.

**Study design:** Retrospective-comparative study conducted between 2012. and 2018., in which the incidence and type of chromosomal abnormalities were compared between two groups of infertile men.

**Participants and methods:** 50 samples of patients with non-obstructive azoospermia and 50 samples with severe oligozoospermia were analyzed. Inclusion criteria were the results of semen analysis, therefore patients with <5 milion sperm cells/mL in ejaculate were classified as severe oligozoospermia and patients with no sperm cells in ejaculate were classified as azoospermia. Standard cytogenetic methods were used; they which are based on analyzing prometaphase chromosomes obtained from short-term cell culture from peripheral blood lymphocytes. G-staining enabled identification of structural and numerical abnormalities, and FISH method enabled identification of structural changes and mozaicism.

**Results:** Total incidence of chromosomal abnormalities in both groups is 9%, while in non-obstructive azoospermia most common form of chromosomal abnormalities was Klinefelter syndrome (75 %), and in severe oligozoospermia group autosomal structural abnormalities had highest rate (2 %). Incidence of chromosomal abnormalities in non-obstructive azoospermia is 16 % and in severe oligozoospermia is 2 %.

**Conclusion:** A significant difference in incidence in chromosomal abnormalities between non-obstructive azoospermia and severe oligozoospermia was observed. Chromosomal abnormalities represent significant causes in male infertility. The results of this research match results from previously published studies.

**Key words:** non-obstructive azoospermia, severe oligozoospermia, male infertility, chromosomal abnormalities

## 10. LITERATURA

1. Agarwal A, Mulgund A, Hamada A, Chyatte MR. A unique view on male infertility around the globe. *Reproductive Biology and Endocrinology*. 2015; 13: 37-45.
2. Pylyp LY, Spinenko LO, Verhoglyad NV, Zukin VD. Chromosomal abnormalities in patients with oligozoospermia and non-obstructive azoospermia. *J Assist Reprod Genet*. 2013; 30: 729- 732.
3. Zaimy MA, Kalautar SM, Shkeikhha MH, Jahaninejad T, Pashaiefar H, i sur. The frequency of Yq microdeletion in azoospermic and oligospermic Iranian infertile men. *Iran J Reprod Med*. 2013 Jun; 11(6): 453-458.
4. Moghbelinejad S, Mozdarani H, Ghoraeian P, Asadi R. Basic and clinical genetic studies on male infertility in Iran during 2000-2016: A review. *Int J Reprod BioMed*. 2018 March; 16(3): 131-148.
5. Pizzol D, Betoldo A, Foresta C. Male infertility: biomolecular aspects. *BioMol Concepts*. 2014; 5(6): 449-456.
6. Kim SY, Kim HJ, Lee BY, Park SY, Lee SH, Seo JT. Y chromosome microdeletions in infertile men with non-obstructive azoospermia and severe oligozoospermia. *J Reprod Infertil*. 2017 Jul-Sep; 18(3): 307- 315.
7. Jungwirth A, Diemer T, Dohle GR, Giwercman A, Kopa Z, Kransz C i sur. European Association of Urology guidelines on male infertility: the 2012 update. *Eur Urol*. 2012 Aug; 62(2): 324- 332.
8. Yatsenko AN, Yatsenko SA, Weedon JW, Lawrence AE, Patel A, Matzuk MM i sur. Comprehensive 5-Year study of cytogenetic aberrations in 668 infertile men. *J Urol*. 2010 April; 183(3): 1636- 1642.
9. Cooper GM, Hausman RE. Stanica- molekularni pristup. 3.izd. Zagreb: Medicinska naklada; 2004.

10. Egozcue S, Blanco J, Vendrell JM, Garcia F, Veiga A, Aran B, i sur. Human male infertility: chromosome anomalies, meiotic disorders, abnormal spermatozoa and recurrent abortion. *Human Reproduction Update*. 2000; 6(1): 93-105.
11. Rooney DE. *Human cytogenetics: constitutional analysis*. 3. izd. New York: Oxford University Press Inc; 2001. Dostupno na adresi: [https://books.google.hr/books?id=Ohl4WApBeUUC&printsec=frontcover&dq=human+cytogenetics&hl=hr&sa=X&ved=0ahUKEwjK\\_O\\_2qY\\_jAhWPtYsKHYa5CUUQ6AEIKjAA](https://books.google.hr/books?id=Ohl4WApBeUUC&printsec=frontcover&dq=human+cytogenetics&hl=hr&sa=X&ved=0ahUKEwjK_O_2qY_jAhWPtYsKHYa5CUUQ6AEIKjAA). Datum pristupa: 11. 05. 2019.
12. Röpke A, Tüttelmann F. Abberations of the X chromosome as cause of male infertility. *European Journal of Endocrinology*. 2017; 177(5): 249- 259.
13. Briggs SF, Reijo Pera RA. X chromosome inactivation: recent advances and a look forward. *Curr Opin Genet*. 2014 October; 28: 78-82.
14. Krausz C, Riera-Escamilla A. Genetics of male infertility. *Nature Reviews Urology*. Springer Nature; 2018. Dostupno na adresi: <https://www.nature.com/articles/s41585-018-0003-3>. Datum pristupa: 27. 01. 2019.
15. Cooper GM, Nickerson DA, Eichler EE. Mutational and selective effects on copy-number variants in the human genome. *Nature Genetics*. 2007; 39: 22-29. Dostupno na adresi: <https://www.nature.com/articles/ng2054>. Datum pristupa: 27. 01. 2019.
16. Wosnitzer MS. Genetic evaluation of male infertility. *Transl Androl Urol*. 2014 Mar; 3(1): 17-26.
17. Beyaz CC, Gunes S, Onem K, Kulac T, Asci R. Partial deletions of Y-chromosome in infertile men with non-obstructive azoospermia and oligoasthenoteratozoospermia in Turkish population. Dostupno na adresi: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5461446/>. Datum pristupa: 21. 10. 2018.
18. Masoudi R, Mazaheri-Asadi L, Khorasani S. Partial and complete microdeletions of Y chromosome in infertile males from South of Iran. *Mol Biol Res Commun*. 2016 Dec; 5(4): 247-255.
19. Silber SJ, Distchele CM. Y chromosome infertility. *Gene Reviews*. 2012 October. Dostupno na adresi: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK1339/>. Datum pristupa: 11. 05. 2019.

20. Hamada AJ, Esteves Sc, Agarwal A. A comprehensive review of genetics and genetic testing in azoospermia. *Clinics (Sao Paulo)*. 2013 Feb; 68 (Suppl 1); 39-60.
21. Xu C, Zhang F-F, Li H-C, Wang M-M, Zhu Y-T, Jiang W-J, i sur. Outcomes of preimplantation diagnostic cycles by fluorescent in situ hybridization of infertile males with nonmosaic 47, XYY syndrome. *Chinese Medical Journal*. 2018 Aug; 131(15): 1808-1812.
22. Stahl PJ, Schelegal PN. Genetic evaluation of the azoospermic or severely oligozoospermic male. *Lippincott Williams & Wilkins*. 2012 Aug; 24: 221-228.
23. Ghorbel M, Baklouti SQ, Adballah FB, Zribi N, Cherif M, Keskes R i sur. Chromosomal defects in infertile men with poor semen quality. *J Assist Reprod Genet*. 2012; 29: 451-456.
24. O' Flynn O' Brein KL, Varghese AC, Agarwal A. The genetic causes of male factor infertility: a review. *Fertil Steril*. 2010 Jan; 93(1): 1-12.
25. Elghezal H, Hidar S, Braham R, Denguezli W, Ajina M, Saad A. Chromosome abnormalities in one thousand infertile males with nonobstructive sperm disorders. *Fertil Steril*. 2006 Dec; 86(6): 1792-5.
26. Foresta C, Garolla A, Bartoloni L, Bettella A, Ferlin A. Genetic abnormalities among severely oligospermic men who are candidates for intracytoplasmic sperm injection. *J Clin Endocrinol Metab*. 2005; 90: 152-6.
27. World Health Organization. WHO laboratory manual for the examination and processing of human semen. 5.izd. Switzerland: 2010. Dostupno na adresi: <https://www.who.int/reproductivehealth/publications/infertility/9789241547789/en/>. Datum pristupa: 15. 03. 2019.
28. Hammami W, Kilani O, Khelifa MB, Ayed W, Abdelhak S, Bouzouita A, i sur. Prevalence of Y chromosome microdeletions in infertile Tunisian men. *Ann Biol Clin*. 2014; 72(3): 331-6.
29. Alhalabi M, Kenj M, Monem F, Mahayri Z, Alchamat GA, Madania A. High prevalence of genetic abnormalities in Middle Eastern patients with idiopathic non-obstructive azoospermia. *J Assist Reprod Genet*. 2013; 30: 799- 805.
30. Jang M-A, Jung CW, Kim S-H. Extra X chromosome in mosaic Klinefelter syndrome is associated with a hematologic malignancy. *Ann Lab Med*. 2013 Feb; 33(4): 297-299.

31. Hofherr SE, Wiktor AE, Kipp BR, Dawson DB, Van Dyke DL. Clinical diagnostic testing for the cytogenetic and molecular causes of male infertility: the Mayo Clinic experience. *J Assist Reprod Genet.* 2011; 28: 1091-1098.
32. Kurjak A, Stavljenic-Rukavina A, Pavelic K. Prenatalna dijagnostika i terapija. Varaždinske Toplice: Tonimir; 2000.
33. Griffiths AJF, Miller JH, Suzuki DT, i sur. An introduction to genetic analysis. 7th edition. New York: W. H. Freeman; 2000. Dostupno na adresi: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK21947/>. Datum pristupa: 17. 04. 2019.
34. Ichioka K, Yoshimura K, Honda T, Takahashi A, Terai A. Paracentric inversion of chromosome 7 (q22-31) associated with nonobstructive azoospermia. *Fertility and Sterility.* 2005 Feb; 83(2): 455-456.
35. Vialard F, Delanete A, Clement P, Simon-Bony B, Aubriot FX, Selva J. Sperm chromosome analysis in two cases of paracentric inversion. *Fertility and Sterility.* 2007 Feb; 87(2): 418.e1-418.e5.
36. Marušić M, i sur. Uvod u znanstveni rad u medicini. 5.izd. Zagreb: Medicinska naklada; 2013.
37. Hsu HK, Su MT, Chen M, Yen P, Kuo PL. Two Y chromosomes with duplication on the distal long arm including the entire AZFc region. *Gene.* 2014 Feb; 536(2): 444-8.
38. Soares AR, Costa P, Silva J, Sousa M, Barros A, Fernandes S. AZFb microdeletions and oligoazoospermia- which mechanisms? *Fertility and sterility.* 2012 April; 97(4): 858-863.
39. Koşar PA, Özgelik N, Koşar A. Cytogenetic abnormalities detected in patients with non-obstructive azoospermia and severe oligozoospermia. *J Assist Reprod Genet.* 2010; 27: 17-21.
40. Fu L, Xiong D, Ding X, Li C, Zhang L, Ding M. Genetic screening for chromosomal abnormalities and Y chromosome microdeletions in Chinese infertile men. *J Assist Reprod Genet.* 2012; 29: 521-527.
41. Li Q, Song N, Cao W, Xie J, Liu C, Wang Y. Relationship between AZFc deletions and testicular histology in infertile South Chinese men with azoospermia and severe oligozoospermia. *Springerplus.* 2016; 5(1): 1805.

## 11. ŽIVOTOPIS

### OPĆI PODACI:

**Ime i prezime:** Ana Jančić

**Datum rođenja:** 17. svibnja 1994.

**Adresa:** Vladimira Nazora 30, Andrijaševci

**e-mail:** ana.jancic175@gmail.com

### OBRAZOVANJE:

Osnovna škola „Ivana Brlić-Mažuranić“, Andrijaševci

Opća gimnazija „Matija Antun Reljković“, Vinkovci

Preddiplomski studij medicinsko laboratorijske dijagnostike, Sveučilišni odijel zdravstvenih studija u Splitu

ERASMUS+ PROGRAM: Ludwik Hirszfeld Institute of Immunology and Experimental Therapy, Laboratory of Clinical Immunogenetics and Pharmacogenetics, Polish Academy of Sciences

Sveučilišni diplomski studij medicinsko laboratorijska dijagnostika, Medicinski fakultet Osijek

**JEZICI:** engleski jezik (jezična škola „Way Out“, Vinkovci), njemački jezik (jezična škola „Lingua“, Osijek)

**OSTALO:** položen vozački ispit B kategorije, član literarne i likovne grupe kroz osnovnoškolsko obrazovanje, član Društva pisaca i pjesnika „Žubor slavonske riječi“ Cerna, volonter u različitim organizacijama Vukovarsko-srijemske županije tijekom srednjoškolskog obrazovanja.