Mikrodelecije Y kromosoma u neplodnih muškaraca

Mustač, Lucija

Undergraduate thesis / Završni rad

2019

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Rijeka / Sveučilište u Rijeci**

Permanent link / Trajna poveznica: https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:193:255482

Rights / Prava: In copyright / Zaštićeno autorskim pravom.

Download date / Datum preuzimanja: **2024-03-29**

Image not found or type unknown

Repository / Repozitorij:

Repository of the University of Rijeka, Faculty of Biotechnology and Drug Development - BIOTECHRI Repository

zir.nsk.hr

UNIRI DIGITALNA KNJIŽNICA

Image not found or type unknown

SVEUČILIŠTE U RIJECI

ODJEL ZA BIOTEHNOLOGIJU

Preddiplomski sveučilišni studij

''Biotehnologija i istraživanje lijekova''

Lucija Mustač

Mikrodelecije Y kromosoma u neplodnih muškaraca

Završni rad

Rijeka, 2019. godina

SVEUČILIŠTE U RIJECI

ODJEL ZA BIOTEHNOLOGIJU

Preddiplomski sveučilišni studij

''Biotehnologija i istraživanje lijekova''

Lucija Mustač

Mikrodelecije Y kromosoma u neplodnih muškaraca

Završni rad

Rijeka, 2019. godina

Mentor rada: prof. dr.sc. Anđelka Radojčić Badovinac

Komentor rada: dr.sc. Sanja Dević Pavlić

UNIVERSITY OF RIJEKA

DEPARTMENT OF BIOTECHNOLOGY

Undergraduate university study

''Biotechnology and drug research''

Lucija Mustač

Y chromosome microdeletions in infertile men

Final work

Rijeka, 2019.

Mentor: prof. dr.sc. Anđelka Radojčić Badovinac

Comentor: dr.sc. Sanja Dević Pavlić

Završni rad obranjen je dana 15.07.2019. pred povjerenstvom:

1. Izv. prof. dr. sc. Elitza Markova Car
2. Doc. dr. sc. Sergej Nadalin
3. Prof. dr. sc. Anđelka Radojčić Badovinac
4. Dr. sc. Sanja Dević Pavlić

Rad ima 40 stranica, 9 slika, 5 tablica i 40 literaturnih navoda.

Sažetak:

Y kromosom svojom strukturom i genima koje sadržava, s naglaskom na gene iz područja AZF (faktora azoospermije) regije, ima ključnu ulogu u kontroli i provođenju normalnog procesa spermatogeneze. U slučaju delecija u navedenoj regiji dolazi do poremećaja u procesu spermatogeneze. Najteži poremećaj koji iz toga proizlazi je neplodnost muškarca. Ona se javlja u najviše zabilježenih slučajeva, iako postoje mnogi uzroci tog poremećaja. Također, postoje značajne varijacije u prikazu učestalosti mikrodelecija, kako u svjetskoj tako i u pojedinim populacijama. Razlog tome je različita veličina ispitivane populacije te razlike u genetičkoj pozadini i okolišnim faktorima kojima su bili izloženi pojedini sudionici istraživanja. Nakon utvrđivanja mikrodelecija u muškaraca, provode se dodatni testovi kako bi se utvrdilo može li se par usmjeriti na neku od mogućih metoda potpomognute oplodnje. Najčešće metode korištene pri liječenju takvih parova su ICSI (engl. *intracytoplasmic sperm injection*) te IVF (engl. *in vitro fertilization*). Kod tih metoda dolazi do direktnog uvođenja spermija u jajnu stanicu ili puštanja spermija da u *in vitro* okolišu sam prodre u jajnu stanicu i oplodi ju. Obje metode imaju velike prednosti jer omogućuju oplodnju i začetak trudnoće kod parova koji prije nisu imali tu priliku. Međutim, metode imaju i značajne nedostatke, koje uključuju 100% prijenos mikrodelecija s oca na sina. Zbog tih razloga, ovaj rad objedinjuje brojna istraživanja mikrodelecija Y kromosoma s ciljem poticanja promišljanja o poboljšavanju metoda medicinski pomognute oplodnje te potencijalnog ukazivanja na neke specifičnosti koje se u pojedinačnim radovima ne bi uvidjele.

Ključne riječi: mikrodelecije, Y kromosom, AZF područje, neplodnost, metode medicinski pomognute oplodnje

Summary:

The Y chromosome plays a key role in controlling and conducting the normal process of spermatogenesis with its structure and the genes it contains, expecialy with the genes of the AZF (azoospermia factor) region. If the deletions appear in the mentioned region they lead to disorders in the process of spermatogenesis. The most severe disorder, resulting from this, is the infertility of a man. Microdeletions are the most common cause of male infertility, althought there are many causes of this disorder. There are also significant variations in the frequency of microdeletions, both in the world and in specific populations. The reason for this is the different size of the examined population, the difference in the genetic background and the environmental factors that were exposed to each participant in the research. After determining microdeletions in males, additional tests are carried out to determine whether a couple can be directed to some of the possible assisted fertilization methods. The most commonly used methods in treating this type of couples are ICSI (*intracytoplasmic sperm injection*) and IVF (*in vitro fertilization*). In these methods direct injection of sperm into the oocite or the penetration of sperm into the oocite in the *in vitro* environment is preformed. Both methods have great advantages because they allow fertilization and the induction of pregnancy in couples who did not have the chance before to concive a child. However, the methods also have significant disadvantages, which include 100% microdeletion transfer from the father to the son. For these reasons, this paper combines numerous studies of the Y chromosome microdeletions with the goal of encouraging thoughts on improving the assisted fertilization methods and potentially pointing to some specificities that would not be seen in the individual papers.

Keywords: microdeletions, Y chromosome, AZF area, infertility, assisted reproductive technology

Sadržaj:

1. Uvod 1

2. Svrha rada 4

3. Y kromosom 5

3.1. Oblik i struktura Y kromosoma 6

3.2. Geni Y kromosoma važni za spermatogenezu 8

4. Mikrodelecije u neplodnosti 15

4.1. Prevalencija mikrodelecija Y kromosoma 17

4.2. Tipovi mikrodelecija Y kromosoma 20

4.3. Korelacija genotipa mikrodelecija Y kromosoma i fenotipa 23

5. Metode potpomognute oplodnje i rizici prijenosa neplodnosti 28

6. Zaključak 33

7. Literatura 34

8. Životopis 39

1. Uvod

Neplodnost parova sve je veći problem današnjice. Većina se parova s neplodnošću susretne tek nakon godinu dana nemogućnosti začeća, nakon čega se oba partnera podvrgavaju različitim testovima pokušavajući doći do uzroka neplodnosti. Dokazano je da je muška neplodnost uzrok čak 40% slučajeva nemogućnosti začeća (1). U ovom radu usredotočit ćemo se na uzroke i posljedice muške neplodnosti kao i na metode kojima je omogućeno osnivanje obitelji takvih parova.

Prije utvrđivanja uzroka muške neplodnosti, od iznimne važnosti bilo je utvrđivanje strukture Y kromosoma te funkcija gena koje on nosi. Utvrđivanje SRY (engl. *seks-determining region Y*) regije na Y kromosomu doprinijelo je skretanju pažnje znanstvenika na važnost Y kromosoma i ostalih gena koje on nosi (2). Godine 1959. Jacobs i suradnici (3) te Ford i suradnici (4) utvrdili su u pacijenata s Klinefelterovim i Turnerovim sindromom prisutnost barem jednog gena na Y kromosomu koji određuje spol i dovodi do razvoja embrija u muško dijete (5). Tek 1990. godine taj je gen bio potvrđen kao SRY (6). Tijekom povijesti, brojni su se znanstvenici bavili dodatnim analizama strukture Y kromosoma i utvrdili 220 gena od kojih su 104 kodirajući geni, 111 pseudogeni i 5 nekatergorizirani, a čak 16 njih se nalazi u regiji faktora azoospermije (AZF) (2). Geni imaju različite funkcije, a u ovom radu pažnja je usmjerena na gene AZF područja čija je najvažnija funkcija kontroliranje i provođenje normalnog procesa spermatogeneze (5). Dokaz važnosti navedene funkcije utvrdili su Tiepolo i suradnici 1976. godine kada su pronašli delecije u distalnim područjima Y kromosoma u azoospermnih muškaraca (7). Na temelju dobivenih rezultata zaključili su da su geni u tom području, kasnije nazvanom AZF područje, ključni za normalno funkcioniranje procesa spermatogeneze. (7)

Uzroci muške neplodnosti su mnogi, ali u većini slučajeva su nepoznati (8). Od poznatih uzroka najčešće su mikrodelecije Y kromosoma, o kojima će se detaljnije pričati u ovom radu, za kojima slijede Klinefelterov sindrom, poremećaj spermatogeneze uslijed varikokele, hipogonadizam, premaleni

volumen ejakulata, posljedice nekih bolesti, tumor testisa i slično (1). Dokazivanje pojedinih uzroka provodi se različitim testovima, nakon kojih se savjetovanjem s liječnikom određuje prigodna terapija. Ukoliko je riječ o mikrodelecijama Y kromosoma, specifično AZF mikrodelecijama, postupci testiranja fizički i psihički su vrlo iscrpljujući za pacijenta te se preporuča genetsko savjetovanje (9). Prilikom savjetovanja, par se upućuje u posljedice koje mikrodelecije ostavljaju na muškarcu, ali i na njegovoj partnerici, a najteža od tih posljedica je neplodnost. Muškarcu se rade testovi otkrivanja mikrodelecija kojima se pomoću specifičnih markera dokazuje određena AZF regija koju je zahvatila mikrodelecija (5). Prema tim zahvaćenim područjima, mikrodelecije se mogu podijeliti na potpune i djelomične AZFa, AZFb, AZFc te kombinirane mikrodelecije (10). Ovisno o veličini zahvaćenog područja, variraju i fenotipske posljedice odražene na muškarca, od smanjenog broja spermija do potpunog nedostatka zrelih spermija u sjemenu (5).

U prošlosti, provodila su se različita istraživanja koja su pokušavala povezati specifične fenotipske posljedice do kojih bi dovele određene vrste mikrodelecija. Zbog različitih parametara, kao što su veličina istraživane populacije, etnička grupa populacije, genetička pozadina sudionika istraživanja, okolišni faktori kojima su bili izloženi sudionici i slično, rezultati jako variraju (11). Također, zbog tih razlika u parametrima, variraju i prevalencije mikrodelecija u svijetu (5). Naime, u mnogim istraživanjima dokazane su različite učestalosti mikrodelecija u neplodnih muškaraca različitih populacija koje variraju od 1.5% (12) pa sve do 18% (13). Činjenica u kojoj se sva istraživanja poklapaju je da učestalost mikrodelecije, a posljedično tome i neplodnost muškaraca, u svijetu sve više raste.

Pojedinačni radovi, koji su se koristili kao literaturni izvori za pisanje ovog rada, sadržavali su pojedine teme sadržane u ovom radu kao što su struktura Y kromosoma, specifični položaj i funkcija gena Y kromosoma, a posebno AZF regije, njihov utjecaj na normalan tok spermatogeneze,

dokazivanje prevalencije mikrodelecija Y kromosoma u različitim populacijama, struktura mikrodelecija AZF područja, fenotipska korelacija sa specifičnim genotipom kojeg bi stvorile mikrodelecije, metode kojima bi se takvim parovima omogućilo začeće djece te koji su rizici tog postupka. Cilj ovog završnog rada bio je ujediniti sva ta istraživanja i dopuniti pojedine dijelove. Ujedinjenim pregledom literature ukazuje se na detaljnu sliku mikrodelecija Y kromosoma, od njihovih začetaka pa do posljedica koje proizlaze iz njih. Također, upućuje se na greške i nedostatke dosadašnjih istraživanja i metoda. Colaco i suradnici su 2018. objavili rad tematike kao i ovaj završni rad, koji sadržava većinu područja bitnih za mikrodelecije Y kromosoma (5). No, pregled obuhvaćen ovim završnim radom pruža detaljniji uvid zadane teme jer sadrži i opis samih mikrodelecija Y kromosoma, njihove strukture i područja koje obuhvaćaju. Također, ovakav ujedinjeni pregled literature omogućuje razmatranje i potiče inovativno razmišljanje o razvijanju novih metoda kojima bi se savladale prepreke ustanovljene dosadašnjim metodama. Bolje razumijevanje uzroka nastanka mikrodelecija može se postići samo uočavanjem potpune slike i detalja ove genetske aberacije.

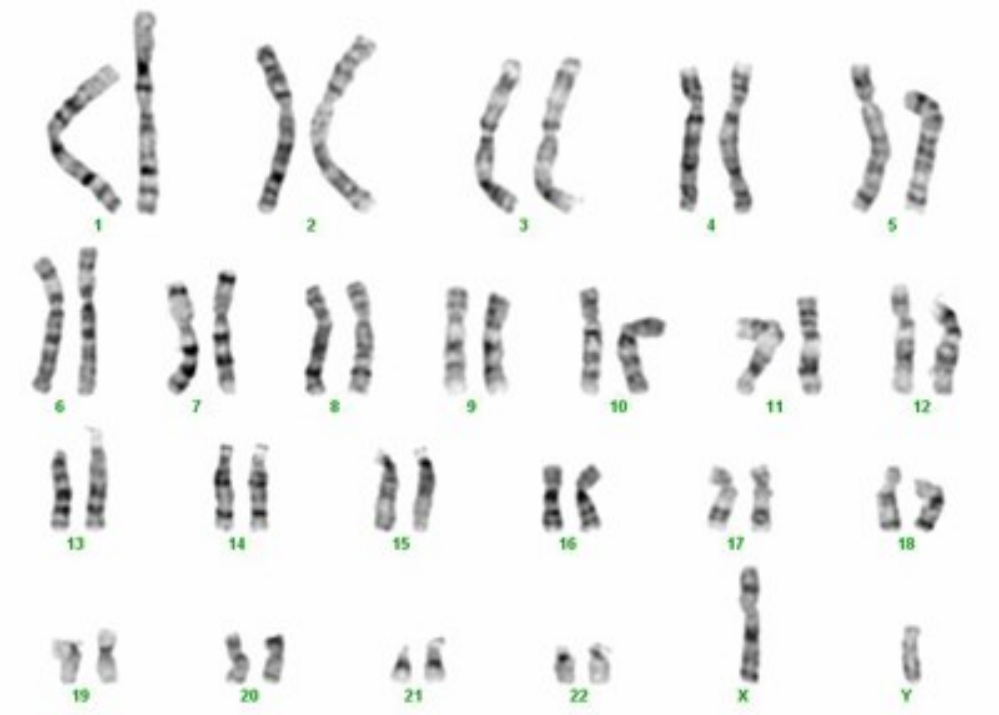
2. Svrha rada

Završni rad pod nazivom *Mikrodelecije Y kromosoma u neplodnih muškaraca* bavi se temom koja svakim danom postaje sve popularnija. Razlog tome je povećana učestalost neplodnosti, specifično muške neplodnosti, kod parova i nemogućnost osnivanja obitelji. Radom je obuhvaćen pregled strukture Y kromosoma s regijama i genima te njihovim funkcijama u spermatogenezi. Također, prikazan je utjecaj mikrodelecija navedenih gena na mušku neplodnost te su opisane metode kojima su podvrgnuti parovi kako bi osnovali obitelj.

U najvećem broju slučajeva, uzrok muške neplodnosti je nepoznat. No, kao najčešći poznati uzrok neplodnosti muškaraca, istraživanja navode mikrodelecije Y kromosoma. Sva ta istraživanja pokušavala su u potpunosti opisati strukturu Y kromosoma sa utvrđenim položajem i funkcijama pojedinih gena tog kromosoma. Neka istraživanja dokazivala su mikrodelecije pojedinih gena i fenotipove koji ih prate. Dodatna istraživanja bavila su se razmatranjem učinkovitosti različitih metoda potpomognute oplodnje kako bi takvim parovima omogućila osnivanje obitelji. Cilj ovog završnog rada bio je sakupiti podatke svih tih različitih istraživanja i povezati njihove rezultate. Ujedinjeni pregled tih istraživanja omogućio bi vrlo detaljan uvid u kompletan raspon njihovih rezultata i prikazao bi njihov utjecaj na mušku plodnost. Ujedinjavanje i obuhvaćanje svih navedenih studija na jedno mjesto može dovesti do nastanka novih spoznaja koje ne bi bile vidljive iz zasebnih radova, ili pak može ukazati na nove smjerove u istraživanjima. Pojedinačni radovi i rezultati obuhvaćeni u jedan pregled literature međusobno se nadopunjuju i omogućuju prikaz cjelovite slike u rasponu od strukture Y kromosoma, funkcije gena, strukture mikrodelecija, fenotipskih obilježja povezanih s tim mikrodelecijama pa sve do metoda potpomognute oplodnje koje će omogućiti osnivanje obitelji takvim muškarcima.

3. Y kromosom

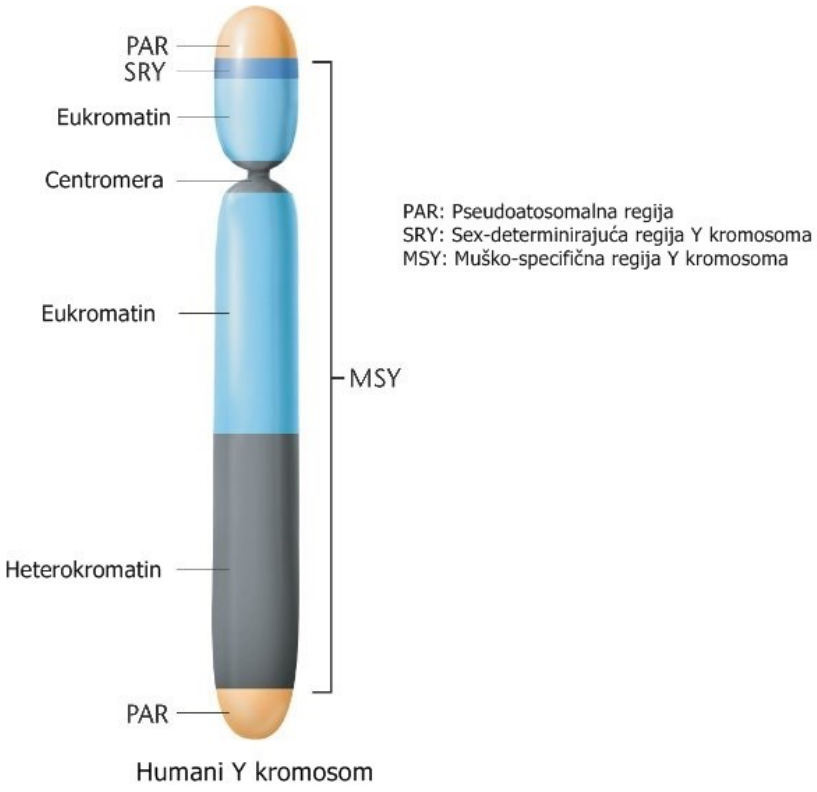
Stanica svakog čovjeka sadržava 46 kromosoma pri čemu su dva kromosoma jednakih veličina i čine jedan par kromosoma (14). Spol određuje 23. par kromosoma, kod žene to su dva X kromosoma, a kod muškarca X i Y kromosom (Slika 1.) (14). Y kromosom je jedan od najmanjih ljudskih kromosoma (9). To je muški spolni kromosom koji se razvio iz autosoma prije 180 milijuna godina (5). Njegova diferencijacija započela je stjecanjem gena za determinaciju testisa, te mnogobrojnim postupnim inverzijama i supresijama sekvenci tijekom rekombinacije između X i Y kromosoma (5). Danas je poznato da je taj kromosom zaslužan za razvoj testisa te za inicijaciju i održavanje urednog ciklusa spermatogeneze u odraslih muškaraca (5). Nastavak ovog poglavlja obuhvaća opis oblika i strukture Y kromosoma, te regija i pripadajućih gena koji su odlučujući faktori tijekom spermatogeneze.



Slika 1. Normalni muški kariotip (14)

3.1. Oblik i struktura Y kromosoma

Y kromosom je submetacentrični kromosom (11). Sastoji od dva kraka, kratkog kraka (Yp) te dugog kraka (Yq) koji su odvojeni centromerom (11). Y kromosom može se podijeliti i na dvije funkcionalne regije, pseudoautosomalne regije (PARs) i nerekombinantnu regiju (NRY) preimenovanu u regiju Y kromosoma specifičnu za muškarce (engl. *MSY, male specific region Y*) (Slika 2.) (11). Pseudoautosomalne regije su dvije male regije koje se nalaze na vršku p kraka te na kraju q kraka Y kromosoma i sadržavaju homologne regije s X kromosomom te su zaslužne za homologno sparivanje dva kromosoma tijekom rekombinacije (5). Nerekombinantnu regiju, odnosno MSY, sačinjava eukromatinski i heterokromatinski dio, a sudjeluje u intrakromosomalnoj izmjeni gena (9).



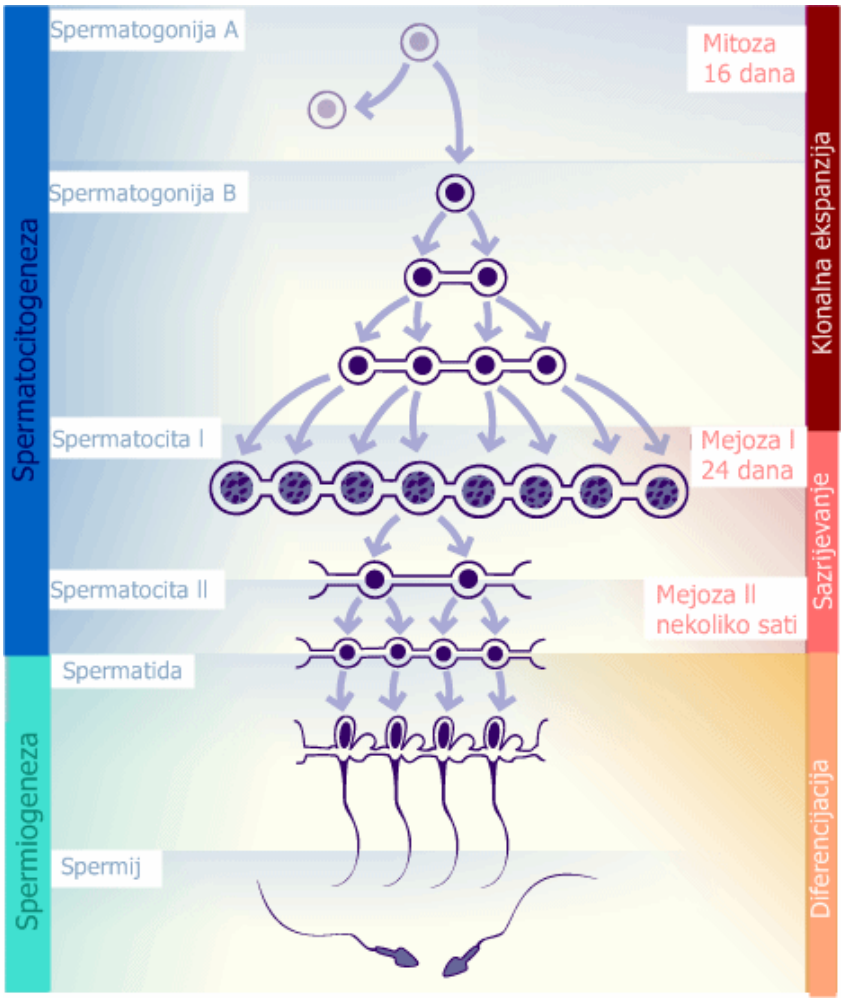
Slika 2. Shematski prikaz Y kromosoma i regija koje ga sačinjavaju (15)

Kao što je već prethodno napomenuto, pseudoautosomalne regije važne su za homologno sparivanje s X kromosomom. To sparivanje je privremeno i genetički nešto drugačije nego sparivanje autosomalnih kromosoma (5), ali dovodi do istog cilja, odnosno do uspješno savladane rekombinacije i krosing-overa. Dokazano je da PARs nisu nužne za mušku plodnost, ali postoje dva slučaja gdje igraju ulogu u muškoj neplodnosti (5). Delecija PAR1 dovodi do potpune muške sterilnosti, a smanjena rekombinacija iste dovodi do povećane frekvencije pojava aneuploidija spolnih kromosoma (monosomija, Turnerov sindrom, 45,X ili trisomija, Klinefelterov sindrom, 47,XXY) u potomaka (5). Zajedno, obje pseudoautosomalne regije sadržavaju 29 gena različitih funkcija u staničnom signaliziranju, regulaciji transkripcije i funkciji mitohondrija (5). Istraživanjima je dokazano i postojanje PAR3, za čije se podrijetlo vjeruje da se radi o transpozonu s X kromosoma, ali njegova je funkcija još nepoznata jer je pronađen u samo 2% populacije (5).

Nerekombinantna regija, odnosno MSY, je regija od 63 Mb od kojih je samo 23 Mb transkripcijski aktivno (11). Ostatak regije čini heterokromatinski dio čija veličina varira u pojedinaca, a sačinjava ga dio ponavljajućih sekvenci obitelji DYZ1 i DYZ2 (11). Eukromatinska regija podijeljena je na 3 podregije, X-preokrenuta, X-degenerirana i amplikonska regija. X-preokrenuta i X-degenerirana regija sastoje se od ponavljajućih sljedova ili pak pojedinih kopija gena homolognih X kromosomu (11). Treća, amplikonska regija, sastavljena je od specifičnih ponavljajućih regija, amplikona, koji su međusobno 99.9% slični (11). Ovo područje je najgušće područje gena i najbitnije jer sadržava regije faktora azoospermije (AZF) čije mikrodelecije uzrokuju najveći postotak neplodnosti kod muškaraca (5).

3.2. Geni Y kromosoma važni za spermatogenezu

Spermatogeneza je komplicirani proces kojim nastaju muške spolne stanice, spermiji (Slika 3.). Traje 70 dana i uključuje mejotičke i mitotičke podjele stanica. Početni korak spermatogeneze je mitotička podjela spermatogonija u primarne spermatocite. Primarne spermatocite ulaze u prvu mejotičku diobu kojom nastaju sekundarne spermatocite s haploidnim brojem kromosoma. Drugom mejotičkom diobom iz sekundarnih spermatocita nastaju okrugle spermatide koje ulaze u proces spermiogeneze gdje napreduju do stadija izduženih spermatida. Taj oblik spermatida ulazi u krajnje procese diferencijacije kojima nastaju zreli spermiji (16).



Slika 3. Shematski prikaz procesa spermatogeneze (17)

Pored hormona koji reguliraju proces spermatogeneze, najveći utjecaj na spermatogenezu ima Y kromosom (18). Područje Y kromosoma koje sadrži gene za regulaciju spermatogeneze je eukromatinska regija dugog kraka Y kromosoma (11). Ti geni mogu se podijeliti u dvije skupine, *house-keeping* geni te geni koji su izbjegli inaktivaciju, a homologni su s X kromosomom (5). Do sada je utvrđeno 18 gena koji su raspoređeni u 3 regije, AZFa, AZFb, AZFc te upitno AZFd, pri čemu nemaju svi geni ulogu u spermatogenezi (5).

Regija AZFa veličine je 1-3 Mb (11) te sadržava gene s jednom kopijom koji su izbjegli inaktivaciju, a homologni su s X kromosomom (Tablica 1.) (5). Gen USP9Y (engl. u*biquitin specific peptidase 9, Y linked*) kodira dugi cisteinski polipeptid koji regulira promet proteina (5). Taj protein sprečava degeneraciju proteina koji su označeni ubikvitinom na način da uklanja ubikvitin sa proteina i stabilizira takve proteine, što je jedan od procesa u razvoju spolnih stanica u muškaraca (5). Također, peptid reprezentira mali antigen histokompatibilnosti koji je uključen u odbacivanje tkivnog presatka te ima funkciju u raku prostate (5). Iako je dokazano da je u većine neplodnih muškaraca došlo do delecije ovog gena (9), prikazani su i slučajevi u kojima je prisutna delecija istog, a muškarci imaju normalan broj spermija (5). Zbog tih dokaza se pretpostavlja da ovaj gen sam po sebi nema ulogu u proizvodnji sjemena i neplodnosti muškaraca, ali u kombinaciji s delecijama drugih gena može uzrokovati neplodnost (9). Sljedeći gen je DBY (engl. *DEAD box RNA helicases, box 3, Y linked*) koji kodira ATP ovisnu RNA helikazu (5). Taj protein je izražen samo u spolnim stanicama i ima važnu funkciju u progresiji staničnog ciklusa iz G1 faze u S fazu inicijacijom translacije ciklina E1 (5). Na taj način dovodi do rane proliferacije spermatogonija, što pokazuje da ima ključnu ulogu u procesu spermatogeneze (5). Gen UTY (engl. *ubiquitously transcribed tetratricopeptide repeat containing, Y linked*) kodira proteine koji kontroliraju mitozu, uključeni su u interakcije između proteina kao šaperoni, minor antigeni histokompatibilnosti, regulatori trankripcije nužne za diferencijaciju prostate, no nije poznata uloga u plodnosti muškaraca (5).

Zadnji gen ove regije je TB4Y (engl. *tymosine beta 4, Y linked*) (5). On kodira novi antigen ljudskih leukocita, djeluje kao minor antigen histokompatibilnosti te je ključni aktivator citotoksičnosti NK stanica, ali njegova uloga specifično u testisima nije poznata (5).

Tablica 1. Geni AZFa regije i njihov utjecaj na spermatogenezu

Regija	Gen	Utjecaj na spermatogenezu
AZFa	USP9Y	Sprečavanje degeneracije proteina označenih ubikvitinom u razvoju spolnih stanica
	DBY	Progresija staničnog ciklusa iz G1 u S fazu -> rana proliferacija spermatogonija
	UTY	Kontrola mitoze
	TB4Y	Nepoznata specifična uloga u testisima

Regija AZFb veličine je 3,2 Mb od čega 1,5 Mb dijeli s AZFc regijom (5). Sastoji se od 3 regije, obitelji ponavljajućih gena, 19 satelitnih ponavljanja i 14 amplikona, odnosno područja s više ponavljajućih sekvenci. (5) Polovina amplikona su specifična za AZFb regiju dok drugih sedam dijeli s AZFc regijom (5). Amplikoni su važni jer doprinose mogućnosti pojave vrlo kompleksnih preuređenja genoma (5). Sve gene i njihove specifične funkcije u spermatogenezi moguće je vidjeti u Tablici 2. Prvi gen ove skupine kao i prvi kandidat AZF regije je RBMY (engl. *RNA-binding motif, Y linked*) (5). On kodira RNA vezujuće proteine specifične za testise koji su izraženi u spermatogonijama, spermatocitama i okruglim spermatidama (11). Uključeni su u dijelove mejotičke i premejotičke regulacije kroz stvaranje nekoliko protein-protein i protein-RNA kompleksa koji imaju različite uloge u različitim stadijima spermatogeneze (5). Delecijom ovog gena dolazi do smanjenja broja spermija, ali opstaje normalan proces

spermatogeneze (5). Također je dokazano da više RBMY gena sadržavaju spermiji s većom pokretljivošću (5). Izvan testisa, ovaj gen djeluje kao onkogen (npr. povećana funkcija gena u hepatocelularna karcinoma) (5). Gen PRY (engl. *PTPN13-like Y linked, [PTPBL]-related gene on Y*) kodira proteine slične proteinima tirozin fosfataza koji su uključeni u regulaciju apoptoze abnormalnih spermija (11). Delecija ovog gena vodi do zastoja mejoze, a ako je ona kombinirana s delecijom RBMY gena dolazi do potpunog zastoja spermatogeneze (5). Gen HSFY (engl. *heat shock transcription factor, Y linked*) kodira protein za koji se pretpostavlja da ima ulogu u regulaciji spermatogeneze (11). Izražen je u jezgri spolnih stanica, dok je koncentracija smanjena u testisima koji imaju zaustavljeno sazrijevanje (5). Gen KDM5D/SMCY (engl. l*ysine demethylase 5D/selected mouse cDNA, Y*) kodira proteine koji igraju ulogu u kondenzaciji kromosoma tijekom leptoten/zigoten faze spermatogeneze na način da remodelira kromatin spolnih stanica (5). Također, ima tumor supresorsku funkciju u slučaju raka prostate, jer uslijed delecije ovog gena dolazi do razvoja metastaza tumora (5). Gen RPS4Y2 (engl. *ribosomal protein S4, Y linked*) kodira djelić ribosomalnog proteina koji veže mRNA, a sudjeluje u posttranskripcijskoj regulaciji spermatogenog procesa (5). Izražen je u testisima i prostati s time da je najveća koncentracija ovog proteina prisutna tijekom spermatogeneze (5). Geni CYorf15 (engl. *chromosome Y open reading frame 15*), EIF1AY (enlg. *eukaryotic translation initiation factor 1A, Y linked*) i XKRY (engl. *X linked kell blood group precursor, Y linked*) su geni u ovoj regiji koji kodiraju proteine čija funkcija nije u regulaciji spermatogeneze, već u regulaciji prometa vezikula, inicijaciji translacije te funkciji membranskog proteina.

Tablica 2. Geni AZFb regije i njihov utjecaj na spermatogenezu

Regija	Geni	Utjecaj na spermatogenezu
AZFb	RBMY	Kodira proteine uključene u različite dijelove mejotičke i premejotičke regulacije spermatogeneze
	PRY	Regulacija apoptoze abnormalnih spermija
	HSFY	Regulacija spermatogeneze
	KDM5D/SMCY	Remodeliranje kromatina spolnih stanica u leptoten/zigoten fazi spermatogeneze
	RPS4Y2	Posttranskripcijska regulacija spermatogenog procesa
	CYorf15 EIF1AY XKRY	Nije poznat utjecaj na spermatogenezu

Regija AZFc treća je regija u eukromatinskom dijelu Yq kraka. To je regija koja ja nužna za završetak procesa spermatogeneze (5). Velika je 4,5 Mb, od kojih 4,0 Mb zauzima palindromski dio regije (5). Sve navedene gene AZFc regije i njihovu funkciju u spermatogenezi moguće je vidjeti u Tablici 3.

Najvažniji gen ove regije je DAZ (engl. *deleted in azoospermia*) gen (9). Gen kodira RNA vezujuće proteine koji imaju ulogu u translacijskoj regulaciji transkripata sa spermatogenom funkcijom (11) te njihov transport i pohranjivanje (5). Ovaj gen sastoji se od dva homologa, DAZL i BOULE (5). Dokazano je da delecija ovog gena dovodi do ozbiljne oligospermije ili azoospermije te nepotpunog zastoja sazrijevanja spermija, a sama delecija BOULE regije uzrokuje azoospermiju u muškaraca (5). Unatoč ozbiljnim posljedicama koje su dokazane delecijom ovog gena, dokazana je i delecija u plodnih muškaraca (5). Sljedeći gen je CDY (engl. *chromodomain protein Y linked*) (5). On kodira proteine koji sadrže N-terminalni dio koji veže

kromatin te pomaže u regulaciji ekspresije gena, remodeliranju kromatina i kodiranju acetiltransferaze histona (5). Delecija ovog gena i prethodno spomenutog DAZ gena dovodi do smanjenja broja spermija i njihove smanjene pokretljivosti te veće podložnosti pojave azoospermije ili teške oligospermije, ali je dokazano i postojanje delecije ovog gena u plodnih muškaraca pa je zaključeno da nije nezamjenjiv za spermatogenezu (5). Gen BPY2 (engl. b*asic protein Y linked, 2*) je gen koji je izražen specifično u testisima, a kodira proteine koji su uključeni u razvoj muških spolnih stanica, odnosno u regulaciju citoskeleta stanica u spermatogenezi (5). Smatra se da proteini kodirani ovim genom ulaze u interakciju s DNA slično kao proteini povezani kromatinom, na koji način onda reguliraju proces transkripcije, replikacije i popravka DNA (5). Gen GOLGA2LY (engl. *golgi autoantigen, golgi subfamily a, 2-like, Y linked*) je gen prepisivan i izražen u testisima, no nije utvrđeno je li to pseudogen ili transkripcijski aktivan gen jer nije pronađen ni u jednom proteosomu testisa (5). Gen CSPG4P1Y (engl. c*hondroitin sulfate proteoglycan 4 pseudogene 1, Y linked*) je još jedan gen AZFc regije za koji nije poznata funkcija, kao ni za TTY4 (engl. *testis-specific transcript, Y linked*) gen za koji se samo vjeruje da je RNA koja ne kodira ni jedan protein (5).

Tablica 3. Geni AZFc regije i njihova uloga u spermatogenezi

Regija	Gen	Uloga u spermatogenezi
AZFc	DAZ	Transkripcijska regulacija, transport i pohranjivanje transkripata spermatogene funkcije
	CDY	Regulacija ekspresije gena, remodeliranje kromatina, kodiranje acetiltransferaze histona
	BPY2	Regulacija citoskeleta stanica u spermatogenezi
	GOLGA2LY CSPG4P1Y TTY4	Nije poznati utjecaj na spermatogenezu

Postojanje AZFd regije pod velikim je upitnikom. Jedna skupina istraživanja dokazuje postojanje AZFd regije između AZFb i AZFc regije, te iznosi dokaze delecije ove regije u neplodnih muškaraca (18, 19). Druga skupina istraživanja to negira, tvrdeći da postojanje još jedne regije između AZFb i AZFc nije moguće (19).

Eukromatinska regija malog kraka Y kromosoma sadrži nekoliko gena koji nemaju ulogu u spermatogenezi već u raznim drugim procesima. SRY (engl. seks-*determining region Y*) je gen koji sudjeluje u inicijaciji razvoja testisa te diferencijaciji bipotencionalnih gonada, a izražen je ne samo u testisima, već i u mnogim drugim tkivima (5). Uz SRY gen, na Yp kraku nalaze se još ZFY (engl. z*inc finger protein, Y linked*), AMELY (engl. *amelogenin, Y linked*), TBL1Y (engl. *transduction beta-like 1Y*), PCDH11Y (engl. *protocadherin 11, Y linked*) i TSPY (engl. *testis-specific protein, Y linked*) geni (5). Oni kodiraju proteine različitih funkcija kao što su transkripcijski faktori, sudionici u biomineralizaciji zuba, korepresori/koaktivatori jezgrinih receptora te protoonkogeni ili tumor supresorski geni (5).

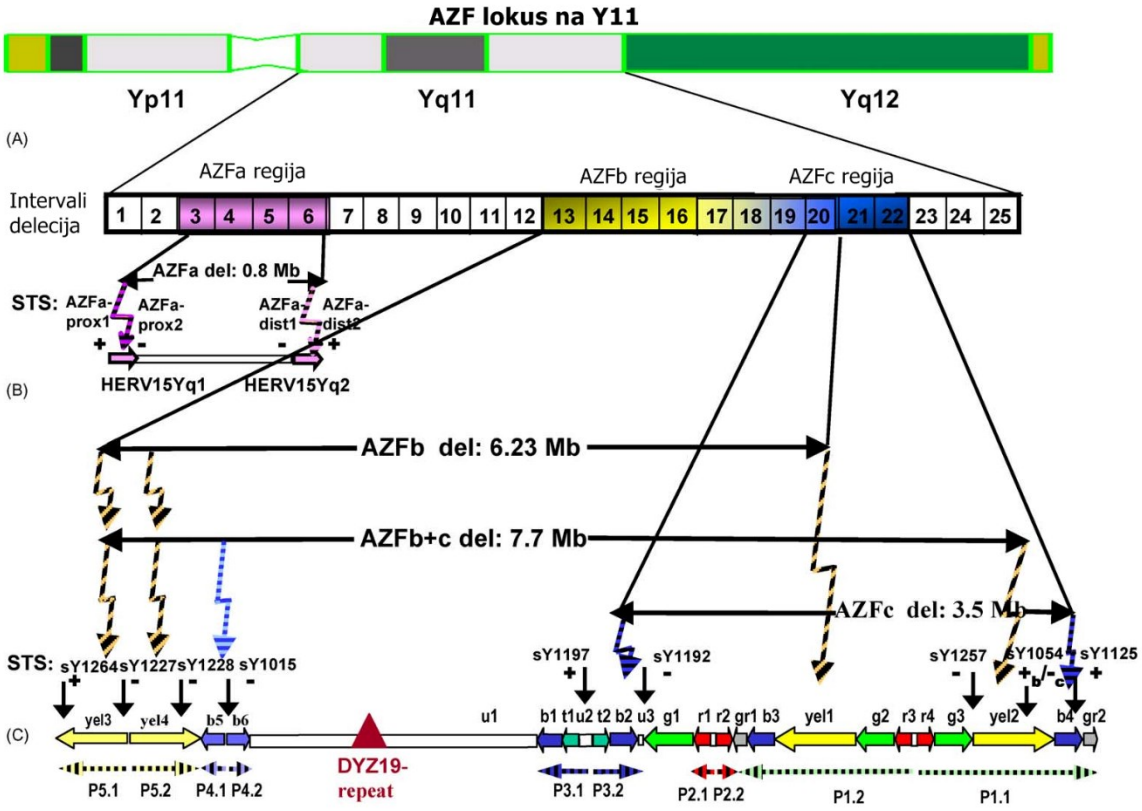
4. Mikrodelecije u neplodnosti

Neplodnost je nesposobnost začeća tijekom razdoblja od godine dana uz nezaštićene spolne odnose, koja zahvaća 15-20% parova današnjice (1). Muška neplodnost je uzrok 40% nemogućnosti začeća, a razlozi su mnogi (1). Neki od uzroka muške neplodnosti su: poremećaj spermatogeneze zbog prethodne varikokele, hipogonadizma ili kriptorhizma, aglutinacija spermija, premaleni volumen ejakulata, tumor testisa, utjecaj gonadotoksina iz okoliša, posljedice nekih bolesti (npr. cistična fibroza, nedostatak receptora androgena, diabetes mellitus…) ili pak genetički razlozi kao što su Klinefelterov sindrom ili mikrodelecije AZF regije Y kromosoma (1).

Mikrodelecije Y kromosoma su male submikroskopske segmentne delecije kojima se ukloni cijela ili dio AZF regije dugog kraka kromosoma (5), a proglašene su najčešćim genetičkim uzrokom muške neplodnosti (8). Muškarci koji pate od neplodnosti usmjeravaju se na testiranje za mikrodelecije. Ukoliko muškarac ima koncentraciju sperme manju od 2 milijuna spermija po mililitru sperme, velika je vjerojatnost da će biti nositelj mikrodelecija na Y kromosomu (20). To se može zaključiti iz rezultata sakupljenih istraživanja koja pokazuju da je najveća učestalost pronalaska mikrodelecija Y kromosoma u muškaraca s koncentracijom sperme manjom od 1 milijuna spermija po mililitru sperme (8). Ista istraživanja pokazuju da je učestalost pronalaska mikrodelecija u muškaraca s koncentracijom većom od 5 milijuna spermija po mililitru sperme vrlo rijetka, samo 0.7% (11).

Analiza mikrodelecija kreće od korištenja specifičnih markera koji će se vezati za AZF područja, STS markeri (engl. *sequence tagged sites*) (Slika 4.) (21). Nakon toga slijedi amplifikacija markera i cijelog genoma pomoću PCR reakcije koja doprinosi većoj vidljivosti markera (22). Ukoliko je došlo do delecije djelomičnog ili potpunog AZF područja, što se utvrdi usporedbom s rezultatima analize kontrolne grupe, markeri neće biti vidljivi i bit će potvrđena delecija tog područja (9). STS markeri u početku nisu bili

pouzdani (21), ali u današnje vrijeme postoji više od 200 takvih markera koji zajedno obuhvaćaju cijelo područje Y kromosoma i daju reprezentativne podatke (9). Brojna istraživanja donose i potvrdu rezultata dobivenih STS markerima i PCR-om, najčešće Southern blott reakcijom, pogotovo ako nije otkriven specifični lokus na Y kromosomu na kojem je došlo do delecije (16). U novije vrijeme otkrivena je još jedna metoda, kvantitativno fluorescentni PCR (QF-PCR), koja omogućuje simultanu vizualizaciju aneuploidija spolnih kromosoma, AZFc i AZFb mikrodelecije, pa čak i djelomične AZFc delecije/duplikacije (22).



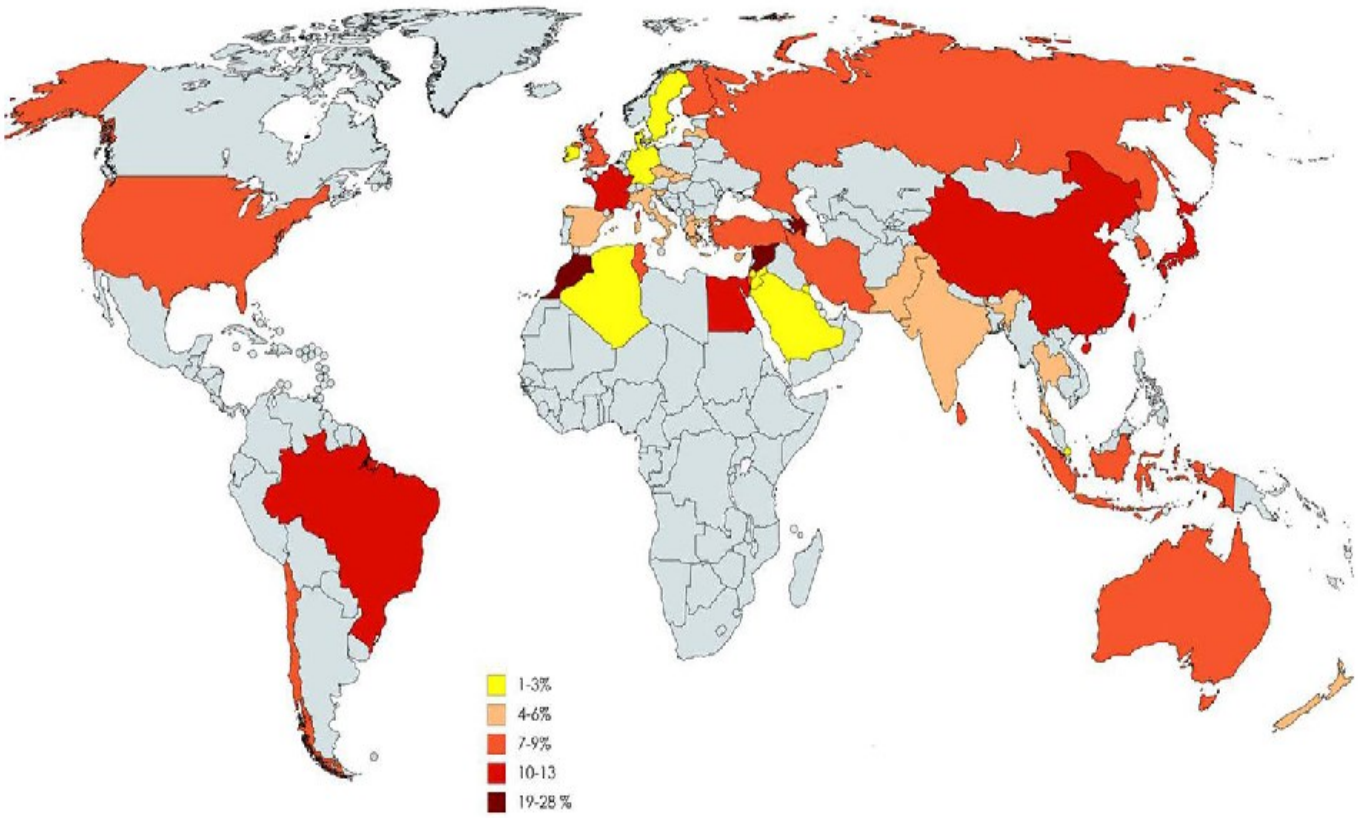
Slika 4. Analiza Y mikrodelecija pomoću STS markera (10)

4.1. Prevalencija mikrodelecija Y kromosoma

Mikrodelecije Y kromosoma pronalaze se kod 1:4000 muškaraca u općoj populaciji (5). Učestalost samih mikrodelecija u neplodnih muškaraca razlikuje se od istraživanja do istraživanja, a ona varira od 1.5% (12) pa sve do 18% (Tablica 4.) (13). Velike varijacije učestalosti mikrodelecija kod neplodnih muškaraca razlog su različitih veličina uzoraka, upotrjebljene metodologije i različite promatrane populacije (5). Mikrodelecije su najčešće udružene s teškim oblicima oligoastenospermije i azoospermije (1), a prevalencija varira od populacije do populacije. Istraživanja pokazuju da najmanju prevalenciju mikrodelecija u neplodnih muškaraca pokazuju muškarci iz Europe (3%) i Australije (5,3%) (5). Istraživanje provedeno u sjeverozapadnoj Hrvatskoj (Istra i Kvarner) pokazuje prevalenciju od 6,1% u muškaraca s azoospermijom, dok mikrodelecije u muškaraca s teškom oligospermijom nisu utvrđene (1). Prosječna prevalencija mikrodelecija u Hrvatskoj iznosi 12,5% u muškaraca s azoospermijom i 4,7 % u muškaraca s teškom oligospermijom (1). Možemo uočiti da je prevalencija utvrđena u ovom određenom istraživanju puno manja od prosjeka, a razlog tome je mala veličina istraživane populacije. Iz Tablice 4. vidljivo je da veću prevalenciju mikrodelecija od hrvatske populacije imaju slovenska, talijanska, iranska i kineska, a manju švedska, turska i marokanska populacija. Jedan od razloga ovakvih odstupanja u prikazanim rezultatima može biti različita veličina istraživanih populacija. Naime, premala veličina ispitivane populacije može pokazati prevalenciju manju od stvarne u ispitivanoj državi. Prevalencije mikrodelecija Y kromosoma ostalih država svijeta vidljive su na Slici 5.

Tablica 4. Prevalencija mikrodelecija u različitim populacijama u azoospermnih (AZO) i oligospermnih (OL) muškaraca

Istraživanje	Istraživana populacija			Prevalencija (%)
	Narodnost	Dijagnoza	N	
Buretić-Tomljanović i sur. (2008) (1)	Hrvatska	AZO	2/33	6,1
		OL	-	-
Peterlin i sur. (2002) (12)	Slovenska	AZO	8/92	8,6
		OL	2/134	1,5
Ferlin i sur. (2006) (21)	Talijanska	AZO	52/625	8,3
		OL	47/1372	3,4
Österlund i sur. (2002) (23)	Švedska	AZO	4/139	2,9
		OL	-	-
Balkan i sur. (2008) (24)	Turska	AZO	1/52	1,9
		OL	-	-
Mirfakhraie i sur. (2010) (25)	Iranska	AZO	12/100	12
		OL	-	-
Liu i sur. (2016) (13)	Kineska	AZO	12/76	15,8
		OL	16/90	17,8
Imken i sur. (2007) (26)	Marokanska	AZO	4/48	3,15
		OL	-	-



Slika 5. Prevalencija mikrodelecija Yq kromosoma u različitim državama svijeta u muškaraca s azoospermijom (5)

4.2. Tipovi mikrodelecija Y kromosoma

Rezultati brojnih istraživanja pokazuju da su najčešće mikrodelecije kontinuirane, odnosno da zahvaćaju susjedne lokuse unutar jednog određenog AZF područja ili više njih (1). Uz to, ustanovljene su i diskontinuirane mikrodelecije koje su opisane mikrodelecijama u AZFc području uz mikrodelecije unutar nesusjednih STS markera u AZFa, AZFb ili AZFc području (1). Na temelju tih pronalazaka mogu se ustanoviti različiti tipovi mikrodelecija. Postoje potpune delecije AZFa, AZFb ili AZFc regije, djelomične delecije te kombinirane delecije (10).

Mikrodelecije AZFa jedne su od najrjeđih delecija koje su otkrivene u samo 3-5% pacijenata (1, 8). One obuhvaćaju 792 kb DNA (27) i dva gena kandidata mikrodelecija USP9Y i DBY (28). Prilikom mikrodelecija ovog područja, specifično USP9Y gena, dolazi do delecije cijelog intervala gena, ali teški fenotip pacijenta stvara se tek u kombinaciji s mikrodelecijom DBY ili UTY gena (9). Mikrodelecije ovog područja rezultat su intrakromosomskih rekombinacija između dvije endogene retroviralne sekvence HERV15yq1 i HERV15yq2 (27).

Mikrodelecije AZFb javljaju se češće, potvrđene su u 35% slučajeva (11). Visoki broj amplikona u toj regiji, koji omogućuje vrlo kompleksna preuređenja, uzrokuje češće pojavljivanje ovih mikrodelecija (5). Potpune mikrodelecije AZFb regije uzrokovane su nejednakim krosing-overom homolognih segmenata između palindroma P5 i proksimalnog kraka palindroma P1 (5). One uklanjaju 6.23 Mb DNA prostirući se kroz 32 kopije gena i 7 genskih obitelji (27).

U mikrodelecijama AZFc regije nedostaje 3.5 Mb DNA te 21 kopija gena i 7 genskih obitelji (27), a potvrđene su kao najučestalije mikrodelecije Y kromosoma sa pojavnošću od čak 60% (11). Uzrokovane su nejednakom homolognom rekombinacijom između amplikona b2 i b4 u palindromima P3 i P1 (1). Palindromi, ponavljajuće regije i blizina ove regije heterokromatinskoj regiji su faktori koji čine ovu regiju podložnu unutarkromosomskim preuređenjima, kao što su delecije, duplikacije i

varijacije broja kopija gena (5). Delecija najvažnijeg gena te regije, DAZ gena, doprinosi patogeno poremećenom skladištenju mRNA, odnosno važnih transkripata testisa kodiranih u prvom koraku spermatogeneze (29) kao i mnogim fenotipskim obilježjima koja će biti objašnjena u sljedećem poglavlju.

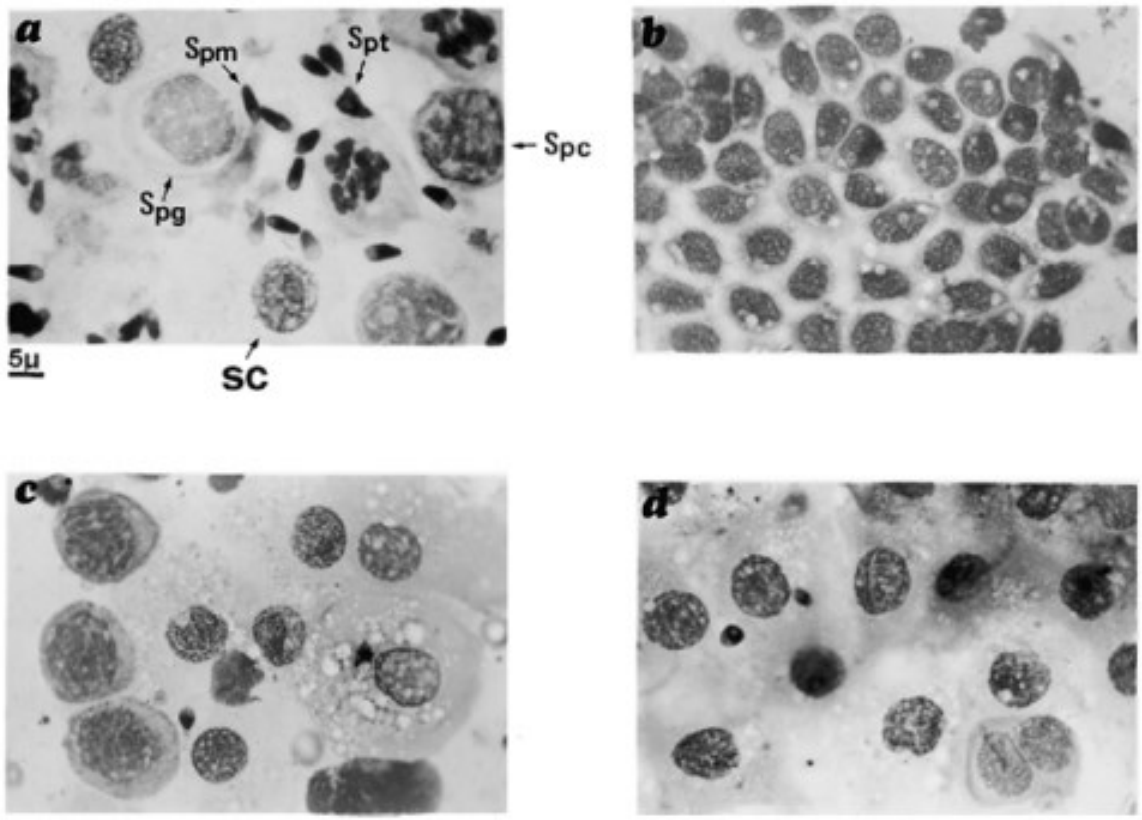
Djelomične AZFc mikrodelecije povezane su s rizikom disfunkcionalne spermatogeneze (27), a razlikuju se prema području koje zahvaćaju (5). Tako razlikujemo gr/gr, b1/b3 i b2/b3 mikrodelecije (5). Mikrodelecije gr/gr zahvaćaju 1.6 Mb, a uzrokovane su homolognom rekombinacijom g1/g2, r1/r3 i r2/r4 amplikona u području P1 i P2 palindroma AZFc regije (5). Ove mikrodelecije obuhvaćaju gubitak dvije kopije DAZ gena, jedne kopije CDY1 gena te jedne kopije BPY2 gena (5). Ukoliko su zahvaćene prve dvije kopije DAZ gena, DAZ1/DAZ2, posljedice će biti teže i predstavljat će faktor rizika za pojavljivanje greške u spermatogenezi (30). Ukoliko dođe do delecije druge dvije kopije DAZ gena, DAZ3/DAZ4, posljedice nisu toliko štetne, štoviše istraživanja pokazuju minimalni do gotovo nikakav utjecaj ovih djelomičnih mikrodelecija na plodnost muškaraca (30). Najviše gr/gr mikrodelecija utvrđeno je u muškaraca koji su bolovali od jednog oblika poremećaja spermatogeneze i koji su imali rekombinaciju između g1/g2 amplikona (10). Mikrodelecije b1/b3 zahvaćaju područje od 1.6 Mb, a obuhvaćaju 6 kopija RBMY1 gena i obje funkcionalne kopije PRY gena (5). Zbog toga što zahvaćaju gene AZFb područja, razlikuju se od preostalih dviju djelomičnih mikrodelecija (5). U istraživanjima je dokazana pojavnost ovih mikrodelecija u jednom od 994 muškaraca što je vrlo rijetko (5). Mikrodelecije b2/b3 zahvaćaju 1.8 Mb te uklanjaju gotovo jednake gene kao i gr/gr mikrodelecije (5). Posljedica su inverzija sekvenci; najveća prevalencija ovih mikrodelecija otkrivena je u Azijata (3%), a najmanja u Europljana (0.5%) (5). Uzroci djelomičnih mikrodelecija, osim homolognih rekombinacija amplikona, mogu biti inverzije, insercije, delecije, ali i mutacije restrikcijskih enzima, primarnih veznih mjesta ili pak poligenska konverzija između sekvenci alela u homolognim amplikonima (10).

Kombinirane mikrodelecije uključuju AZFab, AZFac, AZFad, AZFabc, AZFbc, AZFbd i AZFbcd područja Y kromosoma (27). Svaka od njih rezultira drugim stadijem pogreške spermatogeneze (27). Poznat je uzrok jedino AZFbc mikrodelecije, a to je nehomologna rekombinacija između palindroma P5 i distalnog dijela P1 palindroma (27) pri čemu je zahvaćeno područje veliko 7.7 Mb koje dovodi do gubitka 42 kopije gena (5) ili pak nehomologna rekombinacija između palindroma P4 i distalnog dijela P1 (10) koja dovodi do gubitka 7.0 Mb genoma i 38 kopije gena (5). Učestalost ovih mikrodelecija je 35%, kao i AZFabc (11).

4.3. Korelacija genotipa mikrodelecija Y kromosoma i fenotipa

Istraživanja pokazuju da 25-55% pacijenata s jednim od oblika ekstremne patologije testisa, kao što su hipospermatogeneza, zastoj sazrijevanja spermija ili sindrom samo Sertolijevih stanica (SCOS, engl. *sertoly cell only syndrome*), kao i 5-25% pacijenata s oligospermijom ili azoospermijom nose Y mikrodelecije AZF područja (5). Sa svakom kombinacijom mikrodelecija dolazi određeni fenotip koji i unutar same skupine može varirati od pacijenta do pacijenta (5).

Fenotip potpune AZFa mikrodelecije je smanjena koncentracija spermija u pacijenata, teška oligospermija ili azoospermija koja je rezultat delecije jednog od dva gena kandidata, DBY ili USP9Y (Slika 6.) (28). Mikrodelecijom koja uključuje oba gena nastaje najteži fenotip, a to je SCOS (28). Geni u AZFa području nalaze se specifično u testisima, pa se njihovom delecijom uzrokuje ili gotovo nepostojeći broj spermija ili razvojna smrt spolnih stanica koja vodi do SCOS-a (5). Fenotip djelomične AZFa mikrodelecije nešto je blaži i više varira od pacijenta do pacijenta (5). Prijavljeni su slučajevi s fenotipom od azoospermije do normozoospermije (5). Težinu fenotipa dirigira količina izbrisanih gena u mikrodeleciji (5).



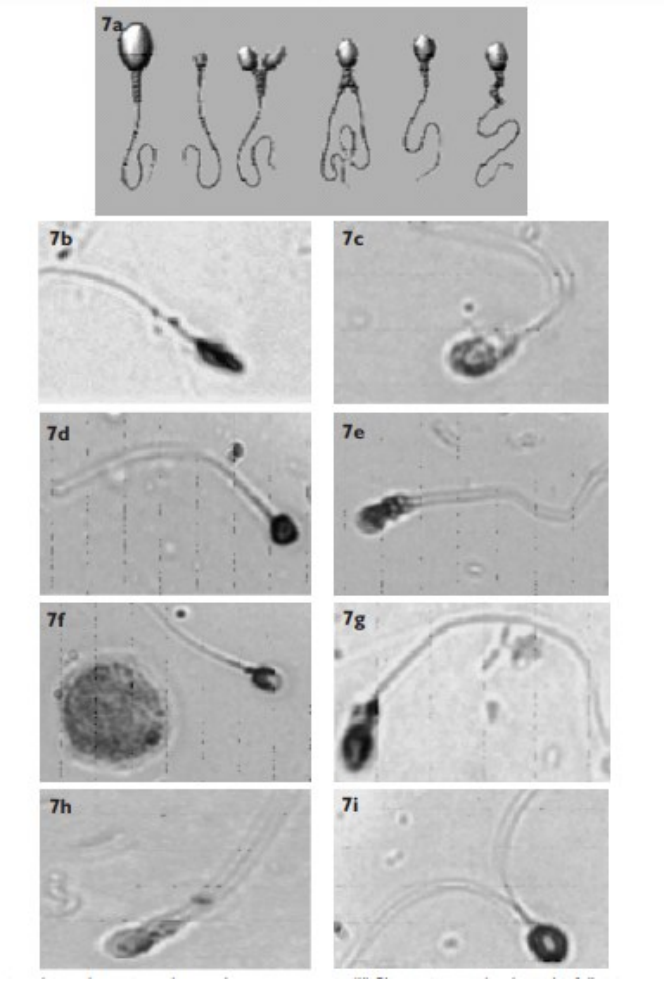
Slika 6. Citologija testisa povezana s AZFa mikrodelecijama (28)

6a - stadiji normalne spermatogeneze u pacijenta s opstruktivnom azoospermijom, Spg - spermatogonija, Spc - spermatocita, Spt - spermatida, Spm - zreli spermij, Sc - Sertolijeve stanice; 6b - morfologija SCOS u pacijenta s delecijom DBY gena koja dovodi do potpunog gubitka zametnog epitela u oba testisa; 6c - teška hipospermatogeneza u pacijenta s delecijom USP9Y gena što rezultira velikim brojem Sertolijevih stanica sa spolnim stanicama normalnih proporcija; 6d - teška hipospermatogeneza u pacijenta s delecijom DBY gena (28).

Pošto geni u AZFb regiji najviše reguliraju rast i sazrijevanje spermija te su ključni za razvoj od stadija mejoze do spermiogeneze, delecijom ovih gena dolazi do gubitka sposobnosti u navedenim stadijima spermatogeneze (5). Pacijenti s utvrđenim delecijama AZFb područja prikazuju fenotip zastoja sazrijevanja spermija, najčešće u stadiju spermatocite, s nedostatkom post-mejotičkih spolnih stanica u sjemenim kanalićima, odnosno azoospermijom, koja je uočena i kod djelomičnih AZFb mikrodelecija te kod kombiniranih mikrodelecija AZFbc (5). Ova delecija može se razviti i do stadija SCOS (1).

Pacijenti s AZFc mikrodelecijama imaju najrazličitije fenotipe (5). Spermatogeneza je dovršena, ali je uočena progresija od oblika srednje oligospermije do azoospermije (5). Također, u istraživanjima je uočeno i prisustvo abnormalnih spermija (13) i različitih defekata u sjemenim kanalićima (16). Ovakva varijacija fenotipa mogla bi biti rezultat progresivne regresije spolnog epitelia ili progresivnog smanjenja koncentracije spermija tijekom vremena kao i utjecaja genetičke pozadine te okolišnih faktora (11).

Mikrodelecije AZFd područja pokazuju fenotip srednje oligospermije, normalni broj spermija, ali i njihov abnormalni izgled i funkciju (Slika 7.) (13).



Slika 7. Prikaz različitih tipova abnormalnih spermija (9)

7a - ilustracija različitih tipova abnormalnih spermija; 7b – mikroskopski prikaz spermija s ušiljenom glavom; 7c – mikroskopski prikaz spermija sa citoplazmatskom kapljicom; 7d – mikroskopski prikaz spermija u obliku pribadače; 7e – mikroskopski prikaz spermija s piriformnim oblikom glave i defektnim središnjim dijelom; 7f – mikroskopski prikaz spermija s piriformnim oblikom glave s kapljicom krvi; 7g – mikroskopski prikaz spermija s malom ovalnom glavom i deformiranim središnjim dijelom; 7h - mikroskopski prikaz spermija s citoplazmatskom kapljicom spojenom s normalnom glavom spermija; 7i – mikroskopski prikaz spermija s dvostrukim repom (9).

Djelomične mikrodelecije ne povezuju se direktno ni s jednim navedenim fenotipom, ali je u istraživanjima uočena povezanost tih mikrodelecija sa smanjenom plodnošću u australskoj populaciji (1). Također, moguća je povezanost djelomičnih mikrodelecija i povećanog rizika od pojave hipospermatogeneze, od oligospermije do azoospermije (5).

Kombinirane mikrodelecije, i to posebno kombinirane AZFabc mikrodelecije, pokazuju najteže oblike fenotipa, SCOS, a pronađeni su i podaci o potpunom zastoju u stadiju spermatocite (21).

Uz mikrodelecije AZF područja, različite varijacije fenotipa unutar delecije jedne AZF regije uzrokuju i posebni faktori, kao što je utjecaj genetičke pozadine i okolišni faktori (8).

5. Metode potpomognute oplodnje i rizici prijenosa neplodnosti

Neplodnost je najčešća posljedica uzrokovana mikrodelecijama Y kromosoma, a nastaje kao rezultat poremećaja spermatogeneze zbog mikrodelecija AZF područja (5). Brojni muškarci nemaju saznanja o svojoj plodnosti do trenutka kada s partnericom pokušavaju dobiti dijete i suoče se s nemogućnošću začeća. Tada se podvrgavaju različitim testovima kojima se pokušavaju utvrditi razlozi njihove neplodnosti. Ukoliko su u pitanju mikrodelecije Y kromosoma, razvijene su metode kojima se uvelike pomaže pri ostvarenju začeća takvih parova. U ovom poglavlju raspravljat će se o dvije dostupne metode te preduvjetima, rizicima i posljedicama koje one donose.

Prije korištenja metoda medicinski pomognute oplodnje (MPO), potrebno je proći kroz procese kariotipizacije za utvrđivanje abnormalnosti kromosoma ili pak direktne metode utvrđivanja mikrodelecija u neplodnih muškaraca (5). Tim testovima bi se trebali podvrgnuti muškarci kojima je utvrđena neplodnost zbog nemogućnosti začeća s partnericom u minimalnom periodu od godine dana (5). Prije kariotipizacije i utvrđivanja mikrodelecija Y kromosoma, provodi se analiza broja, pokretljivosti i morfologije spermija ili volumena ejakulata mikrobiološkim metodama (31). Testovi kariotipizacije, a posebno testovi utvrđivanja mikrodelecija na Y kromosomu, pokušavaju se uvesti u rutinsku kliničku praksu, i to ne samo kako bi se utvrdio razlog neplodnosti, već i za predviđanje uspješnosti postupaka MPO u takvih neplodnih muškaraca (5). Ukoliko je u muškarca došlo do potpune AZFa, AZFb ili AZFbc mikrodelecije, što najčešće rezultira azoospermijom i nepostojanjem zrelih spermija u tkivu testisa, neće biti moguće izvesti ekstrakciju spermija i provesti neku od metoda potpomognute oplodnje (1). No, ukoliko se utvrdi AZFc delecija, postoji šansa za ekstrakciju spermija i njihovo očuvanje ili oplodnju jajne stanice (5). Utvrđivanje mikrodelecija Y kromosoma omogućilo bi i upozoravanje para na mogući prijenos mikrodelecija na sina i posljedice koje iz toga proizlaze (5). U to ne spada samo neplodnost zbog zastoja u

spermatogenezi, već i povećana šansa razvoja raka testisa ili pak neuropsihijatrijskih poremećaja čija je povećana pojavnost utvrđena u muškaraca sa mikrodelecijama (5).

Nakon provedenih testova kariotipizacije i utvrđivanja mikrodelecija Y kromosoma, parovima se predlaže genetsko savjetovanje (9). Genetsko savjetovanje se provodi kako bi se par educirao o genetskim rizicima kojima će biti izloženi tijekom metoda MPO, ali i psihološkom učinku koji će taj proces imati na njih (9). Savjetovanje im također pomaže da shvate potencijalne rizike kojima će biti izloženo novorođeno dijete (9). Naime, muškarci s utvrđenim mikrodelecijama prilikom začeća prenose svoje mikrodelecije na sina, a dokazano je da se te mikrodelecije kod potomaka mogu i povećati (20). Osim prijenosa mikrodelecija, utvrđena je i veća pojavnost rođenja djece s urođenim manama i poteškoćama u učenju (9). Tijekom genetskog savjetovanja raspravlja se i o mogućim dodatnim testovima članova bliže obitelji, genetskim aspektima, prenatalnoj dijagnostici te preimplatacijskoj genetskoj dijagnostici (9).

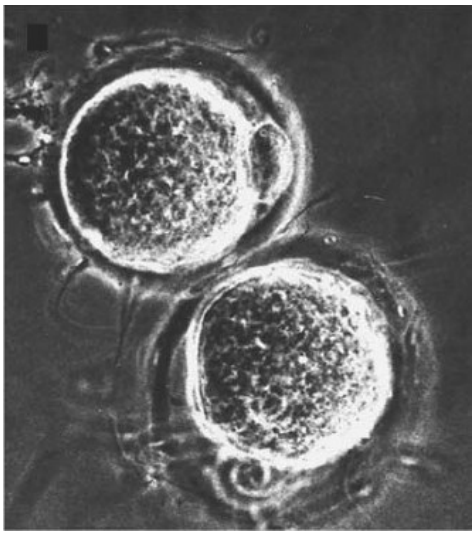
Metoda MPO koja se najčešće koristi pri liječenju neplodnosti izazvane mikrodelecijama Y kromosoma je ICSI (engl. *intracytoplasmic sperm injection*) (Slika 8.) (16). To je metoda u kojoj dolazi do direktnog uvođenja spermija u jajnu stanicu s ciljem da dođe do oplodnje i trudnoće u slučajevima u kojima je broj spermija premaleni ili je njihova pokretljivost smanjena pa ne može doći do prirodne oplodnje (16). U metodi se koriste spermiji dobiveni iz pasjemenika ili direktno iz tkiva testisa (16) metodama kao što su TESE (engl. *testicular sperm extraction*) ili TESA (engl. *testicular sperm aspiration*) (5). Ova metoda zaobilazi sve fiziološke mehanizme povezane s oplodnjom (16) te njenim korištenjem dolazi do apsolutnog prijenosa genetičkih abnormalnosti na dijete (5). Prirodna oplodnja zahtjeva aktivne pokretne spermije koji su prošli normalnu kapacitaciju i akrosomsku reakciju kako bi započeli mehanizme potrebne za ulazak u jajnu stanicu (16). Za razliku od toga, ICSI dopušta promijenjenim spermijima ulazak u jajnu stanicu i razvoj ploda, čime povećava rizik od prijenosa različitih

abnormalnosti koje taj promijenjeni spermij nosi (16). Iako je prethodno u ovom poglavlju spomenuto da muškarci s azoospermijom nisu kandidati za ICSI zbog nedostatka spermija (1), u novije vrijeme je dokazano i suprotno (32). U istraživanju kojeg su proveli J. P. Mulhall i suradnici prikazani su rezultati oplodnje i trudnoće nakon fertilizacije jajne stanice spermijem iz testisa pacijenta koji je nosio mutaciju DAZ gena i fenotipski pripadao skupini azoospermnih muškaraca (32). Iako ovom metodom dolazi do potpunog prijenosa mikrodelecija s oca na sina, fenotip sina može se u potpunosti razlikovati od očevog što je rezultat drugačije genetičke podloge i okolišnih faktora (11). Zbog mogućeg napredovanja i pogoršanja fenotipa sina, preporuča se zamrzavanje njihovih spermija u ranim godinama nakon rođenja (21). Zamrzavanje spermija preporuča se i kod oligospermnih muškaraca koji imaju veliki rizik postupno razviti azoospermiju kako bi u budućnosti izbjegli invazivne metode (21). Drugi veliki rizik koji nosi ova metoda je kromosomska nestabilnost Y kromosoma zbog čestih rekombinacija (1). Zbog te nestabilnosti može doći do gubitka čitavog Y kromosoma te stvaranja embrija sa spermijima nulisomičnim za spolni kromosom (1). Dokazano je da je značajna količina spermija pacijenata s mikrodelecijama Y kromosoma nulisomična za spolni kromosom (11). Oplodnja s takvim spermijima dovodi do stvaranja embrija s Turnerovim sindromom, 45,X ili mozaicizmom spolnih kromosoma (8) što povećava rizik za spontani pobačaj ili pojavu abnormalnog spolovila (1). Kako bi se izbjegao takav rizik, preporuča se preimplatacijska dijagnostika (11).



Slika 8. Prikaz ICSI metode (33)

Druga metoda koju je moguće izvesti kod pacijenata s mikrodelecijama Y kromosoma je IVF (engl. *in vitro fertilization*) (Slika 9.) (11). Metoda IVF je metoda u kojoj je jajna stanica, dobivena iz stimuliranog ili prirodnog ciklusa žene, postavljena u Petrijevu zdjelicu nakon čega se dodaju obrađeni spermiji partnera (34). Dokazano je da spermiji koji nose mikrodelecije AZF područja mogu oploditi jajnu stanicu, što insinuira sposobnost spermija, usprkos mikrodelecijama, za kapacitaciju, akrosomsku reakciju i mogućnost prodiranja u jajnu stanicu te konačno oplodnju jajne stanice (16). Veliki broj parova odlučuje se na tu metodu u kojoj koriste spermije partnera, ali i spermije donora (9).



Slika 9. Mikroskopski prikaz metode IVF (35)

Sažeto prikazane prednosti i nedostaci ovih dviju metoda te uspješnost u razvijanju kliničke trudnoće u žena prikazani su u Tablici 5.

Važno je naglasiti da se, usprkos razvoju metoda koje pomažu neplodnim parovima da dobiju djecu sa svojim genetskim materijalom, na ovaj način u populaciji povećava broj neplodnih muškaraca zbog prijenosa mikrodelecija na potomstvo (16). Prije korištenja ovih metoda, par treba razmisliti o etičnosti razvijanja embrija koji nosi kromosomske abnormalnosti, a koje će rezultirati različitim fenotipskim deformacijama kod djeteta, pri čemu je glavna posljedica neplodnost (16) iz koje proizlazi

smanjenje nataliteta i povećanje rođenja djece s različitim abnormalnostima. Potrebno je u potpunosti informirati par o svim mogućim posljedicama, ali i razviti nove metode koje će omogućiti razvoj zdravog djeteta s normalnim genotipom.

Tablica 5. Prednosti, nedostaci te uspješnost liječenja neplodnosti u muškaraca metodama ICSI i IVF (36)

Metoda	Prednosti	Nedostaci	Trudnoća (%)*
ICSI	• Prijenos genetičkog materijala roditelja na dijete	• Prijenos mikrodelecija na sinove	32,1
	• Korištenje sperme muškaraca s teškim oblicima oligospermije i azoospermije	• Povećani opseg delecija i stvaranje novih aberacija Y kromosoma kod sinova	
	• Jedina MPO nakon ekstrakcije spermija TESA/TESE metodama	• Stvaranje embrija sa spermijima nulisomičnim za spolni kromosom -> Turnerov sindrom, mozaicizam spolnih kromosoma -> spontani pobačaj, abnormalno spolovilo	
IVF	• Oplodnja jajne stanice spermijem koji ima mogućnost sam ući u stanicu i oploditi je	• Neuspješnost u oplodnji sjemenom muškarca s teškom oligospermijom i azoospermijom	7,1

* % postignutih trudnoća spermom azoospermnih muškaraca

6. Zaključak

Najveći broj slučajeva neplodnosti u muškaraca čini neplodnost nepoznatog uzroka. Mikrodelecije Y kromosoma, specifično AZF područja, najčešći su poznati razlog muške neplodnosti. Mikrodelecije Y kromosoma dosad su detaljno ispitane i dokazane, kako njihovo područje tako i posljedice koje imaju na spermatogenezu te fenotipska obilježja muškaraca koji ih nose. Iako su mikrodelecije Y kromosoma vrlo veliki problem parova današnjice, uspjeh pri postizanju trudnoće kod takvih parova pripisan je otkriću metoda potpomognute oplodnje koje se svakim danom sve više usavršavaju. Cilj je pronaći metodu koja, ne samo da omogućuje takvim parovima osnivanje vlastite obitelji, već i sprečava prijenos mikrodelecija Y kromosoma oca na sina. Na taj način omogućilo bi se postizanje trudnoće kod takvih parova, ali bi se i smanjio postotak neplodnosti u svijetu. U današnje vrijeme vrlo su značajne ICSI i IVF metode koje ostvaruju uspjeh u postizanju trudnoće, ali za budućnost to nije dovoljno. Potrebno je dodatno istraživanje i pronalaženje novih metoda kao i usavršavanje postojećih kako bi se došlo do savršene metode i „lijeka" u istrebljenju neplodnosti.

7. Literatura

1. Buretić-Tomljanović A., Vlastelić I., Marić N., Nadalin S., Radojčić Badovinac A. Niska učestalost mikrodelecija AZF područja kromosoma Y u neplodnih muškaraca sjeverozapadne Hrvatske (Istre i Primorja). *medicina.* 2008.

2. Cai, ZM. Y chromosome microdeletion and male infertility: past, present and future. *National Journal of Andrology.* 2010.

3. Jacobs PA, Strongs JA. A case of human intersexuality having a possible XXY sex determining mechanism. *Nature.* 1959.

4. Ford CE, Jones KW, Polai PE, de Almeida JC, Briggs JH. A sex-chromosome anomaly in a case of gonadal dysgenesis (Turner's syndrome). *Lancet.* 1959.

5. Colaco S., Modi D. Genetics of the human Y chromosome and its association with male infertility. *Reproductive Biology and Endocrinology.* 2018.

6. Sinclair AH, Bertha P., Palmer MS, Hawkins JR, Griffiths BL, Foster MJ, Foster JW, Frischauf AM, Lovell-Badge R., Goodfellow PN. A gene from the human sex-determining region encodes a protein with homology to a conserved DNA-binding motif. *Nature.* 1990.

7. Tiepolo L., Zuffardi O. Localization of factors controlling spermatogenesis in the nonfluorescent portion of the human y chromosome long arm. *Human Genetics.* 1976.

8. Krausz C., Forti G., McElreavey K. The Y chromosome and male fertility and infertility. *International journal of andrology.* 2003.

9. Poongothai J., Gopenath TS, Manonayaki S. Genetics of human male infertility. *Singapore medical joural.* svibanj 2009.

10. Vogt, PH. Genomic heterogeneity and instability of the AZF locus on the human Y chromosome. *Molecular and Cellular Endocrinology.* 2004.

11. Krausz C., Degl'Innocenti S. Y chromosome and male infertility: Update, 2006. *Frontiers in Bioscience.* 1. rujan 2006.

12. Peterlin B., Kunej T., Sinkovec J., Gligorievska N., Zorn B. Screening fot Y chromosome microdeletions in 226 Slovenian subfertile men. *Human Reproduction.* 2002.

13. Liu XG, Hu HY, Guo YH, Sun YP. Correlation between Y chromosome microdeletions and male infertility. *Genetics and Molecular Research.* 2016.

14. Kromosomske anomalije. [Mrežno] https://mojabeba.wordpress.com/2009/10/19/kromosomske-anomalije/.

15. Humani Y kromosom. [Mrežno] http://bio3400.nicerweb.com/Locked/media/ch07/Y_chromosome.html.

16. Foresta C., Moro E., Ferlin A. Y Chromosome Microdeletions and Alterations of Spematogenesis. *Endocrine Reviews.* Travanj 2001.

17. *Spermatogeneza.* [Mrežno] http://www.embryology.ch/anglais/cgametogen/spermato03.html.

18. de Kretser DM, Loveland KL, Meinhardt A., Simorangkir D., Wreford N. Spermatogenesis. *Human Reproduction.* 1998.

19. Simoni M., Bakker E., Krausz C. EAA/EMQN best practice guidelines for molecular diagnosis of y-chromosomal microdeletions. State of the art 2004. *International Journal of Andrology.* 2004.

20. Gallego A., Rogel R., Lujan S., Plaza B., Delgado F., Boronat F. AZF gene microdeletions: Case series and literature review. *Elsevier Doyma.* 2014.

21. Ferlin A., Arredi B., Speltra E., Cazzadore C., Selice R., Garolla A., Lenzi A., Foresta C. Molecular and Clinical Characterization of Y Chromosome Microdeletions in Infertile Men: A 10-Year Experience in Italy. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism.* 2006.

22. Plaseska-Karanfilska D., Noveski P., Plaseski T., Maleva I., Madjunkova S., Moneva Z. Genetic causes of male infertility. *BJMG.* 2012.

23. Österlund C., Segersteen E., Arver S., Pousette Å. Low number of Y-chromosome deletions in infertile azoospermic men at a Swedish andrology centre. *International Journal of Andrology.* 2002.

24. Balkan M., Tekes S., Gedik A. Cytogenetic and Y chromosome microdeletion screening studies in infertile males with Oligozoospermia and Azoospermia in Southeast Turkey. *Journal of Assisted Reproduction and Genetics.* 2008.

25. Mirfakhraie R., Mirzajani F., Mahdi Kalantar S., Montazeri M., Salsabili N., Pourmand GR, Houshmand M. High prevalence of AZFb microdeletion in Iranian patients with idiopathic nonobstructive azoospermia. *The Indian Journal of Medical Research.* 2010.

26. Imken L., Houate BE, Chafik A., Nahili H., Boulouiz R., Abidi O., Chadli E., Louanjli N., Elfath A., Hassar M., McElreavey K., Barakat A., Rouba H. AZF microdeletions and partial deletions of AZFc region on the Y chromosome in Maroccan man. *Blackwell.* 2007.

27. Xiao-Wei Y., Zhen-Tong W., Yu-Ting J., Song-Ling Z. Y chromosome azoospermia factor region microdeletions and transmission characteristics in azoospermic and severe oligozoospermic patients. *International Journal of Clinical and Experimental Medicine.* 2015.

28. Foresta C., Ferlin A., Moro E. Deletions and expression analysis of AZFa genes on the human Y chromosome revealed a major role for DBY in male infertility. *Oxford University Press.* 2000.

29. Gatta V., Raicu F., Ferlin A., Antonucci I., Scioletti AP, Garolla A., Palka G., Foresta C., Stuppia L. Testis transcriptome analysis in male infertility: new insight on the pathogenesis of oligo-azoospermia in cases with and without AZFc microdeletion. *BMY Genomics.* 2010.

30. Ferlin A., Tessari A., Ganz F., Marchina E., Barlati S., Garolla A., Engl B., Foresta C. Association of partial AZFc region deletions with spermatogenic impairment and male infertility. *J Med Genet.* 2005.

31. Organization, World Health. WHO laboratory manual for the examination of human semen and sperm-cervical mucus interaction. s.l. : Cambridge university press, 1999.

32. Mulhall JP, Reijo R., Alagappan R., Brown L., Page D., Carson R., Oates RD. Azoospermic men with deletion of the DAZ gene cluster are capable of completing spermatogenesis: fertilization, normal embryonic development and pregnancy occur when retrieved testicular spermatozoa are used for intracytoplasmic sperm injection. *Human Reproduction.* 1997.

33. Intra Cytoplasmic Sperm Injection–ICSI. [Mrežno] https://inspireivf. com/treatment/intra-cytoplasmic-sperm-injection-icsi/.

34. Gardner DK, Simón C. Handbook of In Vitro Fertilization. s.l. : CRC Press, 2017.

35. Sánchez-Gutiérrez M., Izquierdo-Vega JA, Del Razo LM, García-Montalvo EA. Effect of dietary selenium deficiency on the in vitro fertilizing ability of mice spermatozoa. *Cell Biology and Toxicology.* 2008.

36. Son IP, Hong JY, Lee YS, Park YS, Jun JH, Lee HJ, Kang IS, Jun JY. Efficacy of microsurgical epididymal sperm aspiration (MESA) and intracytoplasmic sperm injection (ICSI) in obstructive azoospermia. *Journal of Assisted Reproduction and Genetics.* 1996.

37. Moro E., Marin P., Rossi A., Garolla A., Ferlin A. Y chromosome microdeletions in infertile men with varicocele. *Molecular and Cellular Endocrinology.* 2000.

38. Kent-First M., Muallem A., Shultz J., Pryor J., Roberts K., Nolten W., Meisner L., Chandley A., Gouchy G., Jorgensen L., Havighurst T., Grosch J. Defining regions of the Y-chromosome responsible for male infertility and

identification of a fourth AZF region (AZFd) by Y-chromosome microdeletion detection. *Molecular Reproduction Development.* 1999.

39. Müslümanoğlu MH, Turgut M., Çilingir O., Can C., Özyürek Y., Artan S. Role of the AZFd locus in spermatogenesis. *Elsevier.* 2005.

40. Sertoli-cell-only syndrome. [Mrežno] http://simple-med.blogspot.com/2010/01/sertoli-cell-only-syndrome-germinal.html.

8. Životopis

OSOBNE INFORMACIJE

Mustač Lucija

Maršala Tita 28, 40326 Sveta Marija (Hrvatska)

+385996978919

lucijamustac3@gmail.com

RADNO ISKUSTVO

- 01/07/2017–30/09/2017 Leggett and Platt, Prelog
  Pomoćna radnica u uredu skladišta
- 01/08/2018–31/08/2018 Leggett and Platt, Prelog
  Pomoćna radnica u uredu nabave
- 03/09/2018–21/09/2018 Leggett and Platt, Prelog
  Pomoćna radnica u proizvodnji

OBRAZOVANJE I OSPOSOBLJAVANJE

- 2004–2008 „Područna škola Donji Mihaljevec", Donji Mihaljevec
- 2008–2012 „Osnovna škola Sveta Marija", Sveta Marija
- 2012–2016 „Gimnazija Josipa Slavenskog", Čakovec
- 2016–danas Odjel za biotehnologiju, Sveučilište u Rijeci

  Preddiplomski sveučilišni studij „Biotehnologija i istraživanje lijekova"

OSOBNE VJEŠTINE

Materinski jezik: hrvatski

Strani jezici	RAZUMIJEVANJE		GOVOR		PISANJE
	Slušanje	Čitanje	Govorna interakcija	Govorna produkcija	
engleski	C2	C2	C2	C2	C2
njemački	B1	B1	B1	B1	B1

Komunikacijske vještine

- pristupačna
- srdačna, uvijek nasmijana
- spremna za timski rad
- komunikativna

Organizacijske/rukovoditeljske vještine

- snalažljiva
- organizirana
- prilagodljiva

Poslovne vještine

- odgovorna
- marljiva
- savjesna

Digitalne vještine

SAMOPROCJENA				
Obrada informacija	Komunikacija	Stvaranje sadržaja	Sigurnost	Rješavanje problema
Samostalni korisnik	Samostalni korisnik	Samostalni korisnik	Samostalni korisnik	Samostalni korisnik

- vješto rukovanje Windows Office osnovnim programima (Word, PowerPoint, Excell...)
- poznavanje rada u kemijskim programima Chimera, PyMOL, Avogadro, Gamess, Marvin Sketch
- pretraživanje baza podataka kao što je Protein Data Bank (PDB)