

GENETSKI UZROCI NEPLODNOSTI

GENETIC CAUSES OF INFERTILITY

*Feodora Stipoljev*¹

SAŽETAK

Posljednjih godina došlo je do naglog razvoja dijagnostičkih metoda kojima se može otkriti genetski uzrok neplodnosti, a time procijeniti i rizik prijenosa genetskog poremećaja. Razvojem tehnika potpomognute oplodnje moguće je liječiti veoma teške oblike neplodnosti koji nose značajno veći rizik prijenosa određenih molekularnih promjena na potomstvo. Kod takvih slučajeva veoma je važno otkriti mutacijsku promjenu, jer se time pruža mogućnost davanja precizne genetske informacije o rizicima nasljeđivanja i načina prenatalnog određivanja genotipa ploda. S obzirom na to da ne postoje jedinstvene smjernice u pristupu dijagnostike i liječenja neplodnosti, nastoje se izdvojiti skupine visokorizičnih neplodnih bolesnika prema njihovim kliničkim osobitostima koje će biti podvrgnute rutinskim dijagnostičkim postupcima u svrhu otkrivanja uzroka neplodnosti. Za određene genske poremećaje, kao što su cistična fibroza i sindrom fragilnog X, poznata je uloga u etiopatogenezi neplodnosti. Najnovija molekularna istraživanja genskih mutacija, posebice u β -podjedinici FSH i LH gena, pokazuju svoju dijagnostičku i kliničku vrijednost kod otkrivanja genetskih uzroka neplodnosti.

Ključne riječi: neplodnost, genetika, izvantjelesna oplodnja, mutacija

ABSTRACT

During the last few years, there is a rapidly expansion of new diagnostic techniques improving the detection of genetic causes of infertility. It is followed by a precise risk assessment of genetic change transmission and possibility to chose the most adequate methode of medically assisted reproduction. The treatment of severe forms of both male and female infertility became possible by the development of very sophisticated *in vitro* fertilising techniques. Such patients carry the significantly higher risk of having mutational change in one of the disease genes involved in regulation of human reproduction. The detection of mutation in these patients improve the treatment and prognostic assessment in potential future pregnancies. The unique guidelines for the diagnosis and the treatment of infertile couples still doesn't exist. There are several categories of patients selected by clinical features and associated with some forms of genetic abnormalities. For particular genetic disorders such as cystic fibrosis and fragile X syndrome, their role in pathogenesis of infertility is very well known. Every day, new genetic mutations associated with infertility are discovered. The recent studies involving investigations of significance of molecular mutations, particulary in the gene for the β -subunit of FSH and LH, showed thier diagnostic and clinical value in evaluation both male and female infertility.

Key words: infertility, genetics, medically assisted reproduction, mutation

¹ Zavod za patologiju, citologiju i citogenetiku Opće bolnice "Sveti Duh"

Primljeno: 29. 6. 2007.

Prihvaćeno: 27. 9. 2007.

Adresa za dopisivanje: Dr. sc. Feodora Stipoljev, Zavod za patologiju, citologiju i citogenetiku, Opća bolnica "Sveti Duh", Sveti Duh 64, 10000 Zagreb, tel. 01 3712273. E-mail: stipoljev@yahoo.com

GENETSKI UZROCI ŽENSKE NEPLODNOSTI

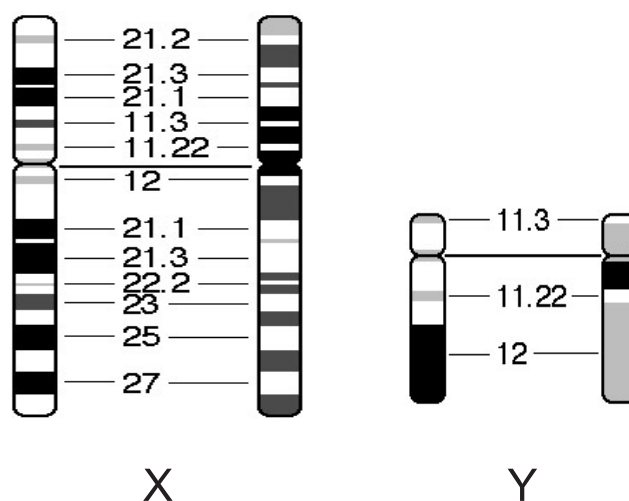
Okolo 2,8% neplodnih žena nosi numeričke abnormalnosti spolnih kromosoma, dok su 2,1% nositelji autosomnih strukturnih razmještanja¹ (tablica 1). Okolo 30% bolesnica s primarnom

amenorejom ima Turnerov sindrom (45,X). Smatra se da se uzrok nalazi u haploinsuficijenciji više gena na X kromosomu, koji reguliraju ovarijsku funkciju i rast i potrebni su u dvije aktivne kopije u ranom embrionalnom razvoju (slika 1). Jedan od takvih gena je transkripcijski čimbenik koji luče osteogene stanice (PHOG-pseudoautosomal homeobox containing osteogenic gene)². Veliki broj bolesnica opisan je s delecijom dijela jednog X kromosoma. Ako se radi o deleciji kratkog kraka X kromosoma prisutan je i niski rast. Ako se radi o deleciji dugog kraka koja uključuje kritičnu regiju Xq13-q26 prisutna je ovarijska disfunkcija. Gonadalna disfunkcija kod bolesnika s delecijom jednog X kromosoma može biti posljedica gubitka funkcionalnih i regulacijskih gena. Postoje dvije regije na X kromosomu koje sadrže gene koji reguliraju ovarijsku funkciju, Xq26-q28 (POF1-premature ovarian failure region 1) i Xq13.3-q22 (POF2-premature ovarian failure region 2). Molekularne promjene u tim regijama vode nastajanju menopauze prije 40. godine³.

Žene nositelji FRAXA premutacijskih alela FMR1 (fragile X mental retardation 1 gene) gena uključenog u patogenezu fragilnog X sindroma mogu imati povećani rizik ulaska u prijevremenu menopauzu prije 40. godine života. FRAXA mutacije nađene su kod 6.5% žena koje su ušle u prijevremenu menopauzu u odnosu na 0.04% u

općoj populaciji⁴. FMR1 gen se eksprimira u gonadama i na dosad još nepoznat način utječe na razvoj jajnika. Premutacije koje obuhvaćaju povećanje broja ponavljajućih tripleta CGG u egzonu1 od 50 do 200 su povezane sa slabim odgovorom na hormonsku stimulaciju žena uključenih u postupak potpomognute oplodnje⁵.

Autosomno recesivni oblik prijevremene menopauze uzrokovan je mutacijama u genu koji kodira receptor za folikul-stimulirajući hormon⁶. Mutacije u genu za receptor folikul-stimulirajućeg hormona opisane su kod žena s hipergonadotropnim hipogonadizmom i primarnom amenorejom i onemogućuju pravilno prikazivanje receptora na površini stanica. Pravilna glikozilacija FSH i njegova funkcija vezivanja receptora vrlo je važna za žensku neplodnost. Istraživanja su pokazala da su osobitosti takvih bolesnica visoke razine FSH i jajnici normalne veličine s antralnim folikulima fenotipske⁷. Sipila i Aula⁸ pokazali su da su svi slučajevi prijevremene menopauze u Finskoj autosomno recesivnog tipa nasljeđivanja i imaju mutaciju A189V u FSHR genu. Zanimljivo je istaknuti da genske varijante FSHR gena određuju odgovor na hormonsku stimulaciju jajnika, gdje nositelji ser680asn varijante pokazuju najnižu osjetljivost na FSH⁹. Kaiser¹⁰ u svom preglednom članku opisuje patogenezu i mehanizme koje mutacije u FSHR genu pokreću uzrokujući sindrom ovarijske hiperstimulacije.



Slika 1. Ideogram X i Y kromosoma

Figure 1 Ideogram of X and Y chromosome

Tablica 1. Kromosomski i genski uzroci ženske neplodnosti

Table 1 *Chromosomes and genes as causes of female infertility*

Kromosomski poremećaji (uključuju i mozaične oblike)	
SPOLNI KROMOSOMI	AUTOSOMI
<ul style="list-style-type: none"> • Turnerov sindrom • Gonadna disgeneza s niskim rastom • Strukturni poremećaj X kromosoma (izokromosom, delecije) • Miješana gonadna disgeneza • Swyerov sindrom • Mozaični oblici s Y-staničnom linijom • X-autosomalne translokacije • 47,XXX (najčešće mozaični oblik) 	<ul style="list-style-type: none"> • Translokacije (Robertsonove i recipročne) • Inverzije
GENSKI POREMEĆAJI	
<ul style="list-style-type: none"> • Sindrom fragilnog X (FRAXA) • Kallmanov sindrom • Sindrom androgenske neosjetljivosti • Geni za β-podjedinicu LH i FSH • Geni za LH i FSH receptore 	

Tablica 2. Kromosomski i genski uzroci muške neplodnosti

Table 2 *Chromosomes and genes as causes of male infertility*

Kromosomski poremećaji (uključuju i mozaične oblike)	
SPOLNI KROMOSOMI	AUTOSOMI
<ul style="list-style-type: none"> • Klineferterov sindrom • Sindrom dvostrukog Y kromosoma • 46,XX ili 45,X muškarci • Strukturne promjene Y kromosoma 	<ul style="list-style-type: none"> • Translokacije (Robertsonove, recipročne) • Inverzije • Nebalansirani strukturni poremećaji • Heterokromatinske promjene
GENSKI POREMEĆAJI	
<ul style="list-style-type: none"> • Mikrodelecije Y kromosoma • Kallmanov sindrom • Sindrom androgenske neosjetljivosti • Cistična fibroza • Geni za β-podjedinicu LH i FSH • Geni za LH i FSH receptore 	

Tablica 3. Preporučena genetska testiranja kod ženske neplodnosti

Table 3 Suggestion for genetic tests in female infertility

	KARIOTIP	FRAXA	CFTR	KAL1
Amenoreja (primarna i sekundarna)	+	+	-	-
Prijevremena menopauza	+	+	-	-
Oligomenoreja s hipergonadotropizmom	+	+	-	-
Hipogonadotropni hipogonadizam	-	-	-	+
Naizgled normalna	+	+	+	-
	(nakon 1 godine spolnih odnosa bez zaštite)*	(kod neprimjerenog odgovora na hormonsku stimulaciju)*		

* prije metoda medicinski potpomognute oplodnje

GENETSKI UZROCI MUŠKE NEPLODNOSTI

Poremećena spermatogeneza može biti uzrokovana brojnim kromosomskim i genskim poremećajima kod neplodnih muškaraca (tablica 2). Strukturne i numeričke kromosomske abnormalnosti prisutne su u oko 5% bolesnika s teškim oblikom oligozoospermije do 15% u azoospermicnih muškaraca, u odnosu na 3% kod muškaraca s normalnim brojem spermija¹. Kromosomski poremećaji kao što je Klinefelterov sindrom vrlo su čest nalaz kod muškaraca s azoospermijom, gdje je suvišni X kromosom prisutan u svim stanicama ili samo u jednoj staničnoj liniji (mozaični oblik). Opisani su i muškarci s XX kariotipom, kod kojih je regija koja određuje razvoj testisa translocirana s Y kromosoma na neki drugi kromosom. Regija koja određuje razvoj testisa nalazi se na kratkom kraku Y kromosoma (SRY – sex determining region). Zbog nepravilne segregacije, strukturne kromosomske abnormalnosti uzrokuju poremećenu spermatogenezu i stvaranje nefunkcionalnih spermija.

AZF regija (azoospermia factor) nalazi se u regiji Yq11 i sadrži tri različite regije: AZFa, AZFb, i AZFc. Najnovija saznanja govore o prisutnosti četvrte regije AZFd. Geni spermatogeneze uključuju ubiquitin specifičnu proteazu 9 (USP9Y) i DBY (dead box Y) u AZFa regiji¹¹, RBMY (RNA vezujuća domena na Y kromosomu) na AZFb regiji¹² i regiju deletiranu kod azoospermije (DAZ) u AZFc¹³. Meta-analiza svih objavljenih istraživanja prisutnosti mutacija na Y kromosomu kod

neplodnih muškaraca pokazala je prisutnost mutacija u 10% slučajeva u odnosu na kontrolne skupine muškaraca s normozoospermijom od 0,4%¹⁴. Najčešće su delecije AZFc regije koje su prisutne u 6–12% azoospermicnih muškaraca¹⁵. Učestalost mikrodelecija Y kromosoma kreće se do 20% kod muškaraca s neobstruktivnom azoospermijom¹⁶. Mikrodelecije u AZFc regiji bile su prisutne u 60%, u AZFb u 16% i AZFa u 5% muškaraca¹⁷.

Mutacije u genu za beta podjedinicu FSH i LH uzrokuju neodgovarajuću spermatogenezu, a time i održavanje proizvodnje zadovoljavajućeg broja spermija kod odraslog muškarca. Kod muškaraca homozigotnih za mutaciju došlo je na različitim razinama do abnormalne proizvodnje spermija, ali nikad do potpunog bloka spermatogeneze¹⁸.

Sindrom androgenske neosjetljivosti je X-vezana recesivna bolest. Gen se nalazi u Xq11-12 regiji. U neplodnih muškaraca s teškim oblikom oligozoospermije i azoospermijom, učestalost točkastih mutacija u genu za androgenski receptor iznosi 2–3%¹⁹. Indeks androgenske neosjetljivosti koji predstavlja umnožak vrijednosti razine LH i testosterona veoma je koristan u probiru bolesnika s povišenim rizikom nositelja mutacija u genu za androgenski receptor¹⁹. Broj ponavljajućih CAG tripleta u egzonu 1 gena za androgenski receptor povećan je u subfertilnih muškaraca^{20,21}.

Cistična fibroza je jedna od najčešćih autosomno recesivnih bolesti s pojavnošću od jedan na 2 500 novorođenih. Kongenitalna obostrana ageneza vas deferensa (CBAVD – congenital bila-

Tablica 4. Preporučena genetska testiranja kod muške neplodnosti.

Table 4 *Suggestions for genetics tests in male infertility*

	KARIOTIP	MIKRODELECIJE Y KROMOSOMA	CFTR	KAL1	ANDROGENSKI RECEPTOR
Azoospermija	+	+(neobstruktivne)	+(CBAVD)	+(HH)	+(visok indeks androgenske osjetljivosti)
Teški oblik oligozoospermije (<10x10 ⁶ /ml)	+	+	+(CUAVD)	-	+(visok indeks androgenske osjetljivosti)
Srednja oligozoospermija (10-20x10 ⁶ /ml)	+(nakon 1 godine spolnih odnosa bez zaštite)*	-	-	-	-
Normozoospermija	+(nakon 1 godine spolnih odnosa bez zaštite)*	-	-	-	-

CBAVD – kongenitalna bilateralna ageneza vas deferensa; HH-hipogonadotropni hipogonadizam; CUAVD – kongenitalna unilateralna ageneza vas deferensa

teral absence of vas deferens) javlja se u oko 1% sterilnih muškaraca²². Oko 80% njih su nositelji genskih mutacija u CFTR genu²³. Oko 20% muškaraca s CABVD su heterozigoti, 20% ima mutaciju na oba alela CFTR gena, a oko 30% ima mutaciju u jednom alelu, dok na drugom nose 5T alel. Kod takvih bolesnika spermatogeneza je normalna, te su oni kandidati za MESA ili TESA postupak izdvajanja spermija, a potom primjenu ICSI tehnike tijekom postupka izvantjelesne oplodnje. Rizik prijenosa cistične fibroze ovisi o genotipu majke.

DIJAGNOSTIČKE SMJERNICE OTKRIVANJA UZROKA NEPLODNOSTI

Smjernice koje su zadala europska stručna društva u polju reproduktivne medicine predstavljaju dobar model obrazaca rada u svrhu otkrivanja genetskih uzroka muške i ženske neplodnosti. Genetsko savjetovništvo predstavlja veoma važan korak ka otkrivanju uzroka neplodnosti. Smjernice i preporuke prikazane su u tablici 3 (za žensku neplodnost) i tablici 4 (za mušku neplodnost). Određivanje genetskih čimbenika neplodnosti pomoći će pravilnoj

procjeni rizika za određeni kromosomski ili genski poremećaj, te prema tome odabiru najbolje metode potpomognute oplodnje.

LITERATURA

1. Gekas J, Thepot F, Turleau C, Siffroi JP, Dadoune JP, Briault S i sur. Association des Cytogeneticiers de Langue Francaise. Chromosomal factors on infertility in candidate couples for ICSI: an equal risk of constitutional aberrations in women and men. *Hum Reprod* 2001;16:82-90.
2. Rao E, Weiss B, Fukami M, Rump A, Niesler B, Mertz A i sur. Pseudoautosomal deletions encompassing a novel homeobox gene cause growth failure in idiopathic short stature and Turner syndrome. *Nat Genet* 1998;19:70-3.
3. Uzielli ML, Guarducci S, Lapi E, Cecconi A, Ricci U, Ricotti G i sur. Premature ovarian failure (POF) and fragile X premutation females: from POF to fragile X carrier identification, from fragile X carrier diagnosis to POF association dana. *Am J Med Genet* 1999;348:452-4.
4. Murray A, Webb J, Dennis N, Conway G, Morton N. Microdeletions in FMR2 may be a significant cause of premature ovarian failure. *J Med Genet* 1999;36:767-70.

5. Ferraretti AP, Gianaroli L, Magli MC, Bafaro G, Colacurci N. Female poor responders. *Mol Cell Endocrinol* 2000;161:59-66.
6. Aittomaki K, Herva R, Stenman UH, Juntunen K, Ylostalo P, Hovatta O i sur. Clinical features of primary ovarian failure caused by a point mutation in the follicle-stimulating hormone receptor: correlations between receptor function and phenotype. *Mol Endocrinol* 1999;13:1844-54.
7. Beau I, Touraine P, Meduri G, Gougeon A, Desroches A, Matuchansky C i sur. A novel phenotype related to partial loss of function mutations of the follicle stimulating hormone receptor. *J Clin Invest* 1998;102:1352-9.
8. Sipila K, Aula P. Database for the mutations of the Finnish disease heritage. *Hum Mutat* 2002;19:16-22.
9. Greb RR, Grieshaber K, Gromoll J, Sonntag B, Nieschlag E, Kiesel L i sur. A common single nucleotide polymorphism in exon 10 of the human follicle stimulating hormone receptor is a major determinant of length and hormone dynamics of the menstrual cycle. *J Clin Endocr Metab* 2005;90:4866-72.
10. Kaiser UB. The pathogenesis of the ovarian hyperstimulation syndrome. *New Engl J Med* 2003;349:729-32.
11. Foresta C, Ferlin A, Moro E. Deletion and expression analysis of AZFa-genes on the human Y chromosome revealed a major role for DBY in male infertility. *Hum Mol Genet* 2000;9:1161-9.
12. Elliott DJ, Millar MR, Oghene K, Ross A, Kiesewetter F, Pryor J i sur. Expression of RMB in the nuclei of human germ cells is dependent on a critical region of the Y chromosome long arm. *Proc Natl Acad Sci USA* 1997;94:3848-53.
13. Reijo R, Lee TY, Salo P, Alagappan R, Brown LG, Rosenberg M i sur. Diverse spermatogenic defects in humans caused by Y chromosome deletions encompassing a novel RNA-binding protein gene. *Nat Genet* 1995;14:192-9.
14. Foresta C, Ferlin A, Gianaroli L, Dallapiccola B. Guidelines for the appropriate use of genetic tests in infertile couples. *Eur J Hum genet* 2002;10:303-12.
15. Kuroda-Kawaguchi T, Skaletsky H, Brown LG, Minx PJ, Cordum HS, Waterston RH i sur. The AZFc region of Y chromosome features massive palindromes and uniform recurrent deletion in infertile men. *Nat Genet* 2001;29:279-86.
16. Moro E, Marin P, Rossi A, Garolla A, Ferlin A. Y chromosome microdeletions in infertile men with varicocele. *Mol Cell Endocrinol* 2000;161:67-71.
17. Foresta C, Moro E, Ferlin A. Y chromosome microdeletions and alterations of spermatogenesis. *Endocr Rev* 2001;22:226-39.
18. Layman LC. Human gene mutations causing infertility. *J Med Genet* 2002;39:153-61.
19. Hiort O, Holterhus PM, Hörter T, Schulze W, Kremke B, Bals-Pratsch M i sur. Significance of mutations in the androgen receptor gene in males with idiopathic infertility. *J Clin Endocrinol Metab* 2000;85:2810-5.
20. Mifsud A, Sim CK, Boettger-Tong H, Moreira S, Lamb DJ, Lipshultz LI i sur. Trinucleotide (CAG) repeat polymorphisms in the androgen receptor gene: molecular markers of risk for male infertility. *Fertil Steril* 2001;75:275-81.
21. Wallerand H, Remy-Martin A, Chabannes E, Bermond L, Adessi GL, Bittard H. Relationship between expansion of the CAG repeat in exon 1 of the androgen receptor gene and idiopathic male infertility. *Fertil Steril* 2001;76:769-74.
22. Chillon M, Casals T, Mercier B, Bassas L, Lissens W, Silber S i sur. Mutations in the cystic fibrosis gene in patients with congenital absence of the vas deferens. *N Engl J Med* 1995;332:1475-80.
23. Attardo T, Vicari E, Mollica F, Grazioso C, Burrello N, Garofalo MR i sur. Genetic, andrological and clinical characteristics of patients with congenital bilateral absence of the vas deferens. *Int J Androl* 2001;24:73-9.