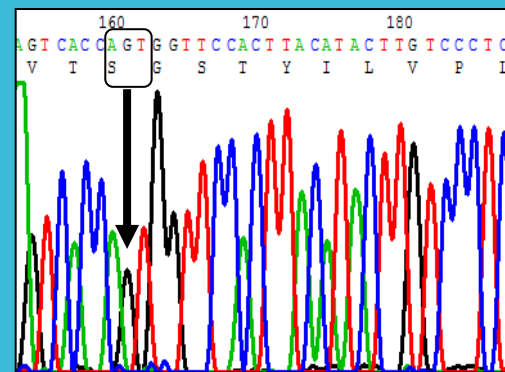
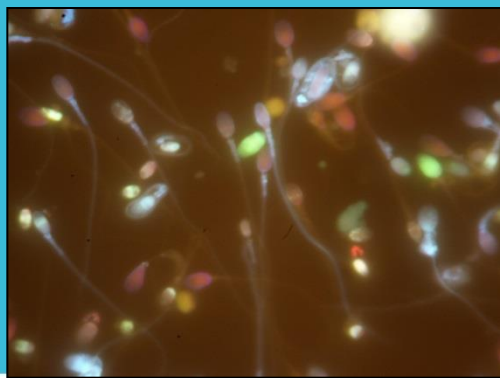
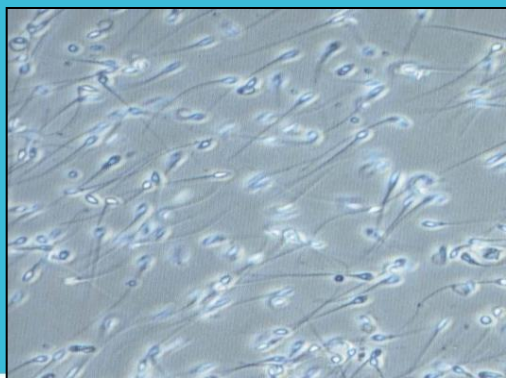


Nové možnosti diagnostiky geneticky podmienenej neplodnosti muža

RNDr. Petrovič Robert, PhD.,
RNDr. Černáková Iveta, PhD.



Mužská idiopatická neplodnost'

- Predstavuje patofyziologickú dilemu a terapeutickú výzvu
- Konzervatívne metódy málo úspešné
(jedine úprava životosprávy zmysluplná)
- V ére asistovanej reprodukcie je väčšina foriem empiricky riešená pomocou ICSI (+ špecifický výber spermií IMSI, PICSI, MACS)

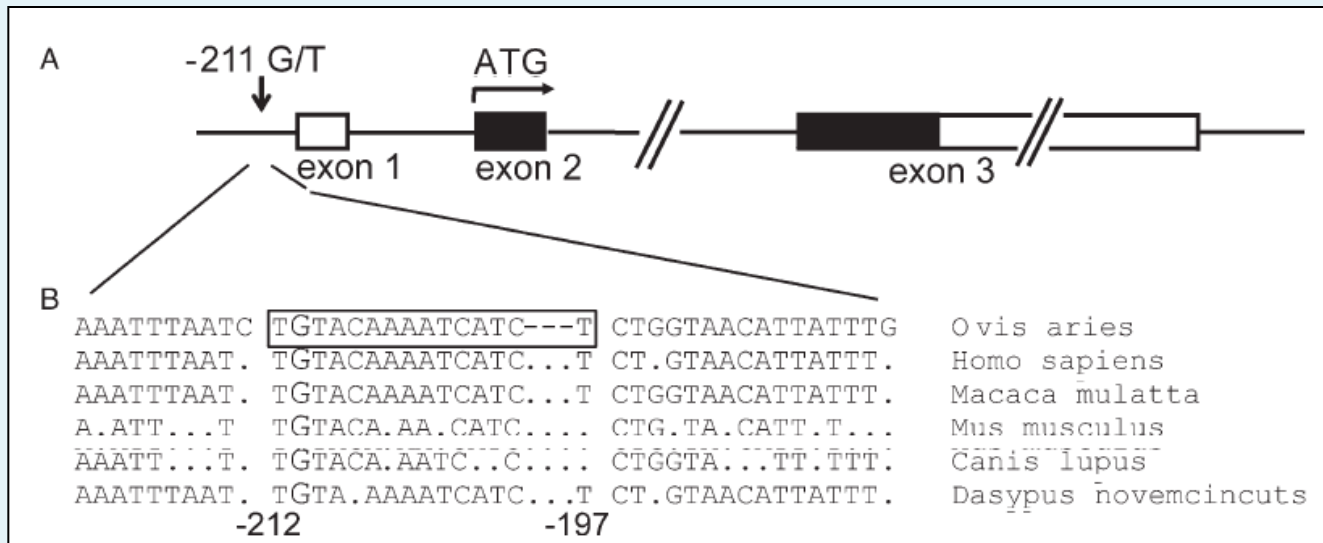
JE MOŽNÉ ZLEPŠIŤ KVALITU SPERMIÍ MENEJ INVAZÍVNE?

V minulosti liečba gonadotropínmi predpisovaná napriek chýbajúcim dôkazom a štúdiám

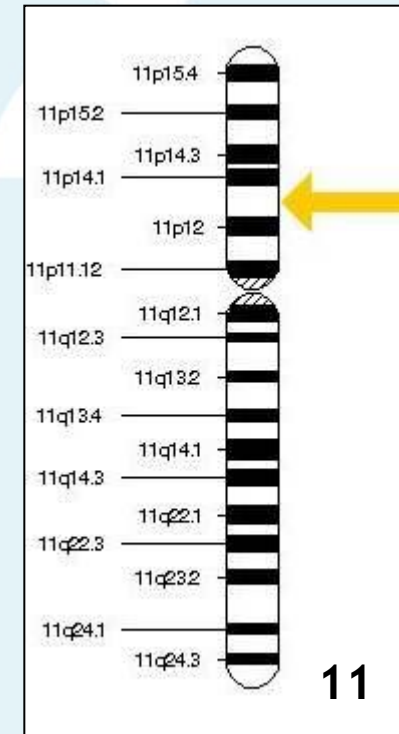
NOVÉ POZNATKY O GENOTYPE *FSHR* A *FSHB*



FSHB - gén kóduje β -podjednotku FSH



- Folikulostimulačný hormón (FSH) produkovaný adenohypofýzou je centrálnym hormónom ľudskej reprodukcie, esenciálny pre vývoj pohlavných žliaz a pre produkciu gamet
- U žien FSH stimuluje rast folikulov vo vaječníkoch
- **U mužov stimuluje Sertoliho bunky v semeníkoch a podporuje produkciu spermii**



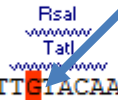
Polymorfizmus v promótoře *FSHB* génu

- **Promótor *FSHB* génu:** kontrola transkripcie samotného génu *FSHB*.
- **SNP rs10835638** záměna nukleotidu **-211G>T**
- **Štandardná alela G** **Mutovaná alela T** (20 – 25% populácie v Európe a USA)
- **Funkčný význam derivovanej alely T:**
signifikantné zníženie transkripčnej aktivity *FSHB* génu o 50%
- **Genotypy:**
 - 211G/-211G Normálny homozygot (100% aktivity)
 - 211G/-211T Heterozygot -25% aktivity *FSHB* génu
 - 211T/-211T Homozygot pre derivovanú alelu T
.... -50% aktivity *FSHB* génu (znížená hladina FSH)
.... Oligozoospermia, menší objem testes, nižšia hladina testosterónu a vyššia hladina LH v sére



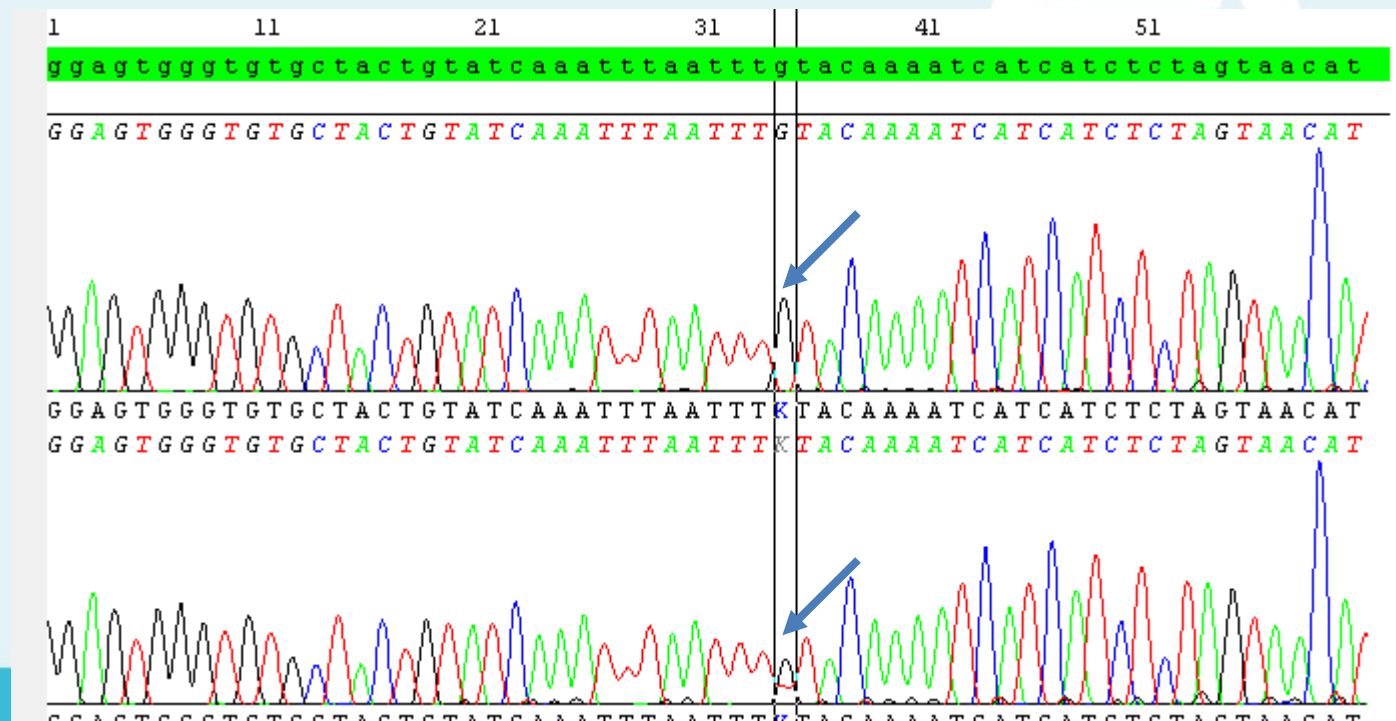
Polymorfizmus v promótoře *FSHB* génu

1	GGAGCCAGAT	CATGAAATGT	TTCTCTTTG	TTTGTITCTT	CCTTCACAGC	TTTTGATATG	CTCTTGGAGC	AATTTATTAA	CCATATTTTT	TAATGCATCT
	CCTCGGTCTA	GTACTTTTACA	AAAGAGAAAC	AAACAAAAGAA	GGAAGTGTCTG	AAAACATATAC	GAGAACCCTCG	TAAATAAATT	GGTATAAAAA	ATTACGTAGA
101	CCTGAACAGA	GTCAAAGCAA	TACTTGGAAA	GGACTCTGAA	TTTCCTGATT	TAAAGATACA	AAAGAAAAAT	CTGGAGTCAC	AATTAATTTG	AGAAGGTAAA
	GGACTTGTCT	CAGTTTCGTT	ATGAACCTTT	CCTGAGACTT	AAAGGACTAA	ATTTCTATGT	TTTCTTTTAA	GACCTCAGTG	TTAATTAAAC	TCTTCCATT
201	GGAGTGGGTG	TGCTACTGTA	TCAAATTTAA	TTTCTACAAA	ATCATCATCT	CTAGTAACAT	TATTTTTTCT	AATCTACTGC	GTTTAGACTA	CTTTAGTAAA
	CCTCACCCAC	ACGATGACAT	AGTTTAAATT	AAACATGTTT	TAGTAGTAGA	GATCATTGTA	ATAAAAAAGA	TTAGATGACG	CAAATCTGAT	GAAATCATT
301	GCTTGATCTC	CCTGTCTATC	TAAACACTGA	TTCACTTACA	GCAAGCTTCA	GGCTAGCATT	GGTC			
	CGAACTAGAG	GGACAGATAG	ATTTGTGACT	AAGTGAATGT	CGTT	CGAAGT	CCGATCGTAA	CCAG		



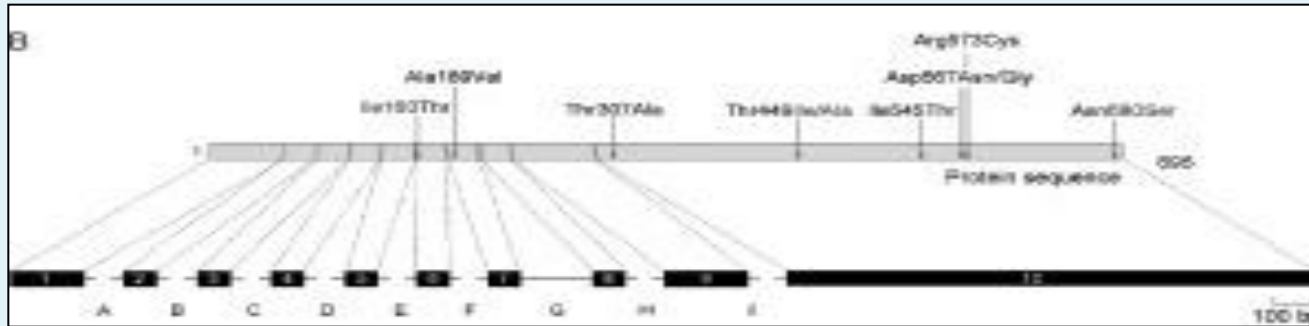
Genotyp:

homozygot G/G



heterozygot G/T

FSHR - gén receptor FSH

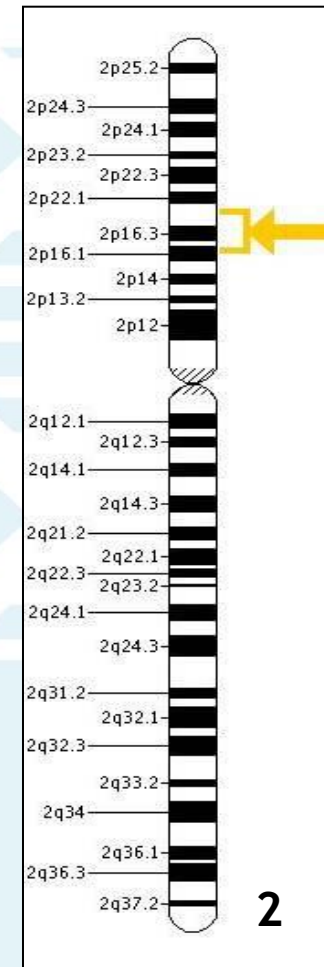


➤ **Promótor *FSHR* génu:** SNP rs1394205 -29G>A

Dominantný vplyv, výskyt nezávisle na SNP v exóne 10

➤ **Exón 10 *FSHR* génu:** SNP rs6165 c.919G>A ... 307: Thr/Ala
SNP rs6166 c.2039A>G.... 680: Asn/Ser

Veľmi tesná, avšak NIE absolútna genetická väzba



Polymorfizmus v promótoře *FSHR* génu

- **Promótor *FSHR* génu:** kontrola transkripce samotného génu *FSHR*
- **SNP rs1394205 záměna nukleotidu -29G>A**
- **Štandardná alela G mutovaná alela A**
- Funkčný význam derivovanej alely T: významné zníženie transkripčnej aktivity *FSHR* génu až o 60% u mužov s AA genotypom
- **Genotypy:**
 - 211G/-211G Normálny homozygot
 - 211G/-211A Heterozygot -30% aktivity *FSHR* génu
 - 211A/-211A Homozygot pre derivovanú alelu A
 - - 60% aktivity *FSHR* génu
 - Oligozoospermia



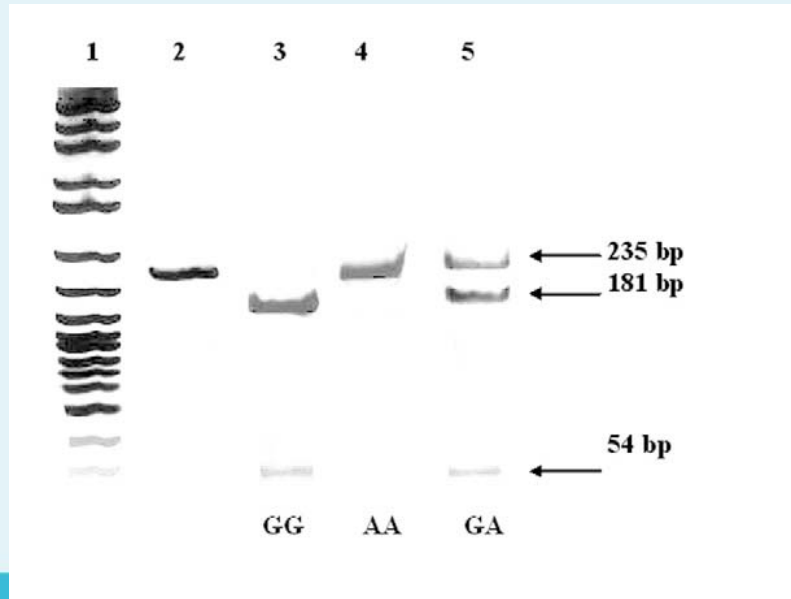
Analýza polymorfizmu *FSHR* -29G>A (rs1394205) pomocou restrikčného štiepenia s *MbolI* (PCR-RFLP)

		MbolI ~~~~~																													
+3																															
1	GGAGCTTCTG AGATCTGTGG AGGTTTTTCT CTGCAAATGC AGGAAGAAAT CAGGTGGATG GATGCATAAT TATGGCCCTG CTCCTGGTCT CTTTGCTGGC CCTCGAAGAC TCTAGACACC TCCAAAAAGA GACGTTTACG TCCTTCTTTA GTCCACCTAC CTACGTATTA ATACCGGGAC GAGGACCAGA GAAACGACCG																														
+3	Ala Phe Leu Ser Leu Gly Ser Gly Cys His His Arg Ile Cys His Cys Ser Asn Arg Val Phe Leu Cys Gln Glu Ser Lys Val Thr Glu Ile Pro Ser Asp																														
101	ATTCTGAGC TTGGGCTCAG GATGTCATCA TCGGATCTGT CACTGCTCTA 51 bp TTTT TCTCTGCCAA GAGAGCAAGG TGACAGAGAT TCCTTCTGAC TAAGGACTCG AACCCGAGTC CTACAGTAGT AGCCTAGACA GTGACGAGAT TGTCCCAAAA AGAGACGGTT CTCTCGTTCC ACTGTCTCTA AGGAAGACTG																														
+3	Leu Pro Arg Asn Ala Ile Glu																														
201	CTCCCGAGGA ATGCCATTGA ACTGTGAGTA TCAGAGGGAG GGGGAA CAAC TGCATGGCTG GCATTT GAGGGCTCCT TACGGTAACT TGACACTCAT AGTCTCCCTC CCCCTT GTTG ACGTACCGAC CGTAAA																														

neštiepený PCR produkt = 235 bp

RFLP po štiepení s *MbolI*: Alela G 181 bp a 54 bp

Alela A 235 bp



dráha 1: marker molekulovej hmotnosti

dráha 2: PCR produkt - neštiepený amplifikát

dráha 3: homozygot G/G

dráha 4: homozygot A/A

dráha 5: heterozygot A/G



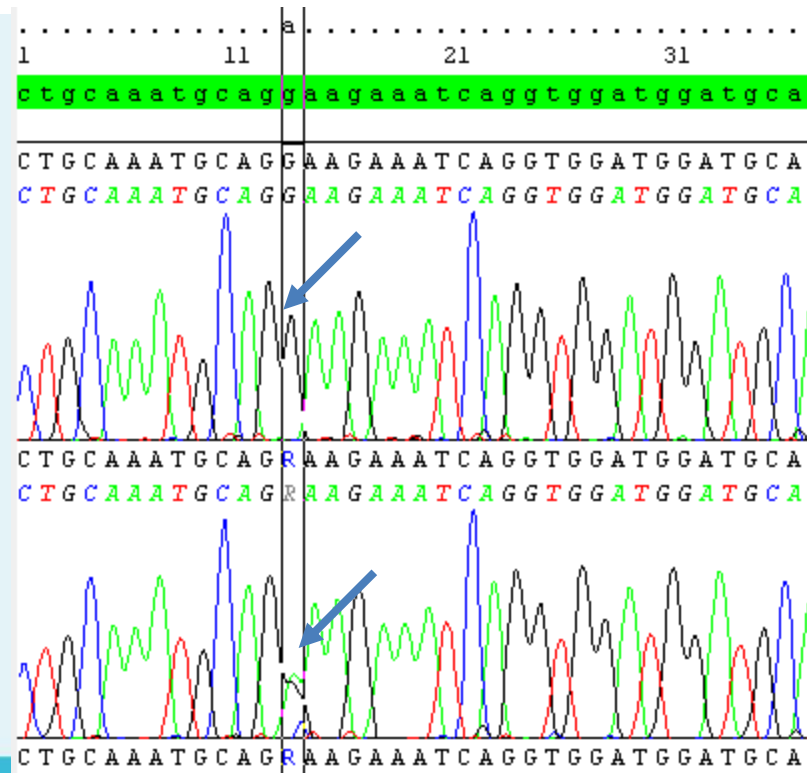
Analýza polymorfizmu *FSHR* -29G>A (rs1394205) pomocou sekvenovania DNA

												MbolI ~~~~~										Met Ala Leu Leu Leu Val Ser Leu Leu Ala									
+3	1	GGAGCTTCTG	AGATCTGTGG	AGGTTTTTCT	CTGCAAATGC	AGGAAGAAAT	CAGGTGGATG	GATGCATAAT	TATGGCCCTG	CTCCTGGTCT	CTTTGCTGGC																				
		CCTCGAAGAC	TCTAGACACC	TCCAAAAAGA	GACGTTTACG	TCCTTCTTTA	GTCCACCTAC	CTACGTATTA	ATACCGGGAC	GAGGACCAGA	GAAACGACCG																				
+3		Ala Phe Leu Ser	Leu Gly Ser Gly	Cys His His Arg	Ile Cys His Cys Ser	Asn Arg Val Phe	Leu Cys Gln Glu	Ser Lys Val Thr	Glu Ile Pro Ser	Asp																					
101		ATTCTGAGC	TTGGGCTCAG	GATGTCATCA	TCGGATCTGT	CACTGCTCTA	51 bp	TTTT	TCTCTGCCAA	GAGAGCAAGG	TGACAGAGAT	TCCTTCTGAC																			
		TAAGGACTCG	AACCCGAGTC	CTACAGTAGT	AGCCTAGACA	GTGACGAGAT	TGTCCCAAAA	AGAGACGGTT	CTCTCGTTCC	ACTGTCTCTA	AGGAAGACTG																				
+3		Leu Pro Arg Asn	Ala Ile Glu																												
201		CTCCCGAGGA	ATGCCATTGA	ACTGTGAGTA	TCAGAGGGAG	GGGGAA	CAAC	TGCATGGCTG	GCATTT																						
		GAGGGCTCCT	TACGGTAACT	TGACACTCAT	AGTCTCCCTC	CCCCTT	GTTG	ACGTACCGAC	CGTAAA																						

Genotyp:

homozygot G/G

heterozygot G/A



Polymorfizmy v exóne 10 *FSHR* génu

- **SNP rs6165 záměna nukleotidu c.919G>A 307: Thr/Ala**
- **Štandardná alela G derivovaná alela A**
- **SNP rs6166 záměna nukleotidu c.2039A>G 680: Asn/Ser**
- **Štandardná alela A derivovaná alela G**
- Funkčný význam: Rôzna senzitivita receptora k FSH podľa genotypu
Rôzna odpoveď receptora na exogénne podanie FSH v závislosti na genotype



Polymorfizmy v exóne 10 *FSHR* génu

➤ Genotypy:

Thr307Asn680/Thr307Asn680 Normálny homozygot (WT)

Thr307Asn680/Ala307Ser680 Heterozygot
.... Stredne znížená senzitivita
receptora k FSH

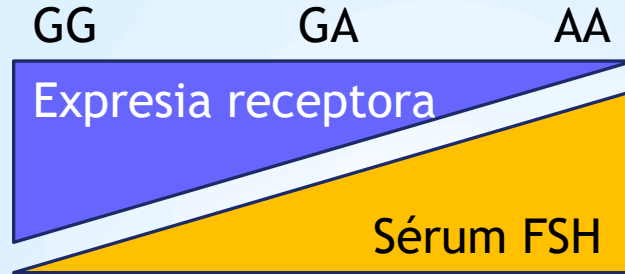
Ala307Ser680/Ala307Ser680 Mutovaný homozygot
.... Znížená senzitivita receptora k FSH

➤ Rekombinantné genotypy: **Ala307Asn680** (1%)
Thr307Ser680 (1%)



Vplyv na hladinu FSH

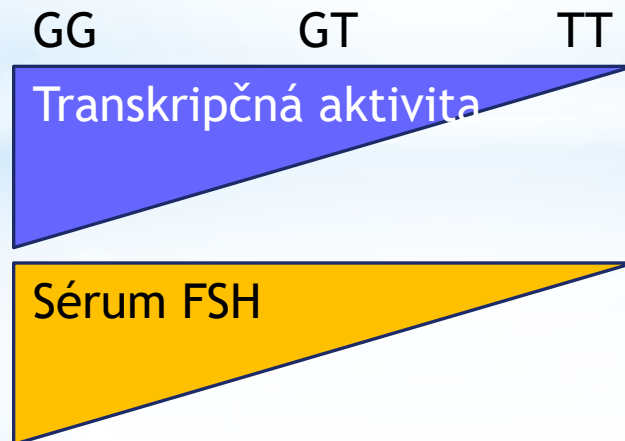
FSHR -29G>A
(promótor)



FSHR p.N680S
(exón 10)



FSHB -211G>T
(promótor)



FSHR

FSHB

Význam vyšetrenia *FSHB* a *FSHR* polymorfizmov

Nositelia „znevýhodňujúcej“ kombinácie alel *FSHR/FSHB*:

- až 45% všetkých mužov
- nesú **riziko zníženej reprodukčnej fitness**
- **Mužskí nositelia ktoréhokoľvek „znevýhodňujúceho“ genotypu** s novou, derivovanou alelou T v promótoře *FSHB* génu, A alelou v promótoře *FSHR* génu a/alebo prítomným Ala/Ser variantom v kódujúcej časti *FSHR* **môžu profitovať z exogénneho podania FSH** v podobe zlepšenia parametrov spermioqramu a tvorbou kvalitnejších spermií



Odporúčaná liečba

150 IU/3-krát týždenne po dobu 12 týždňov

(prof. M. Simoni, 2014)

podstatne výraznejší účinok sa dosahuje

u mužov – homozygotov, resp. zložených heterozygotov



Vyšetrenie polymorfizmov *FSHR* dáva možnosť objasnenia príčiny oligoastenozoospermie

Liečba FSH môže byť prínosom najmä u normogonadotropných infertilných mužov s normálnym karyotypom a bez blokády spermatogenézy

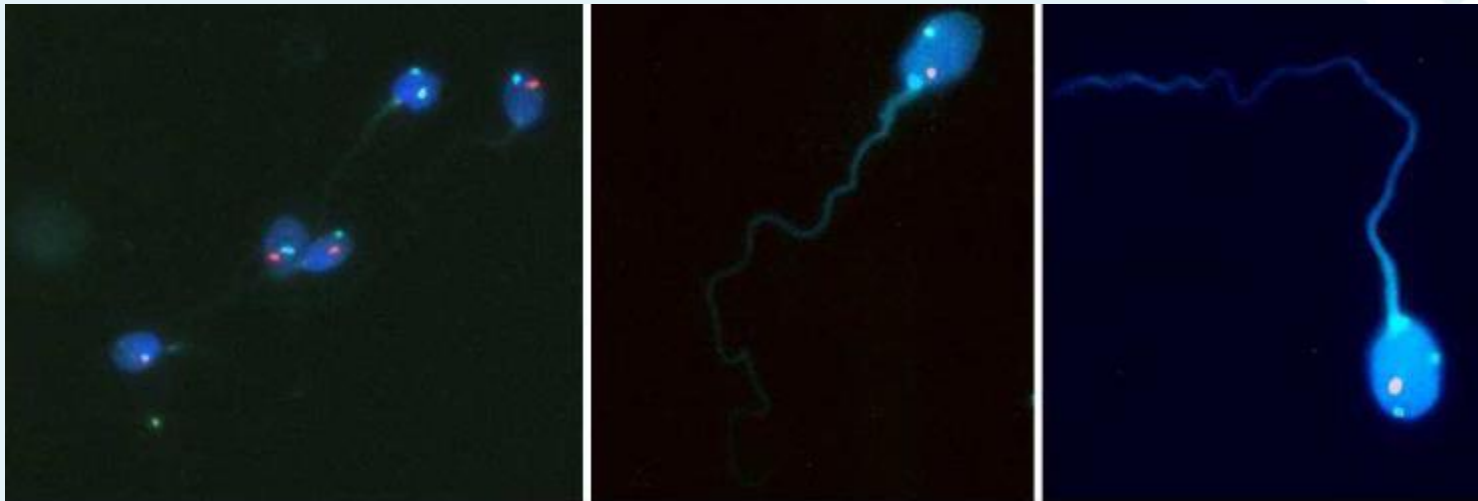
Po liečbe sa zvyšuje počet, pohyblivosť a morfológia spermií

Dáva šancu otehotniť párom, kde len samotné IVF bolo neúspešné



Vyšetrenie aneuploidií v spermiách

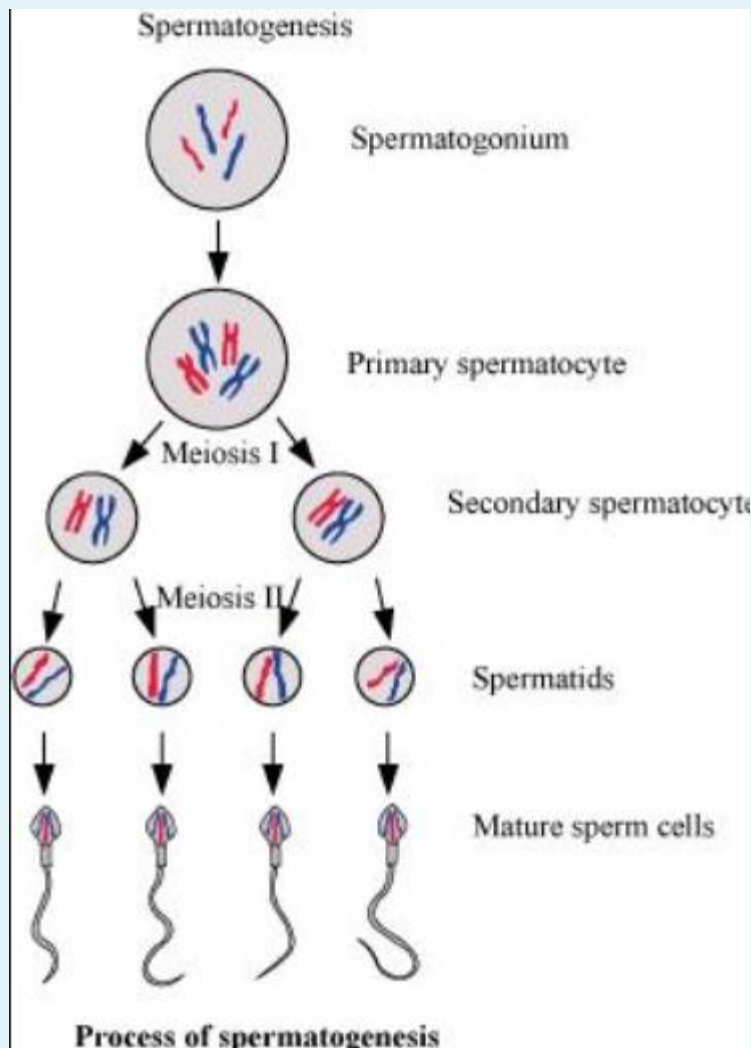
- AneuSperm



Interfázna FISH, vyšetrenie spermií

Vyšetrenie aneuploidií v spermiách

- AneuSperm



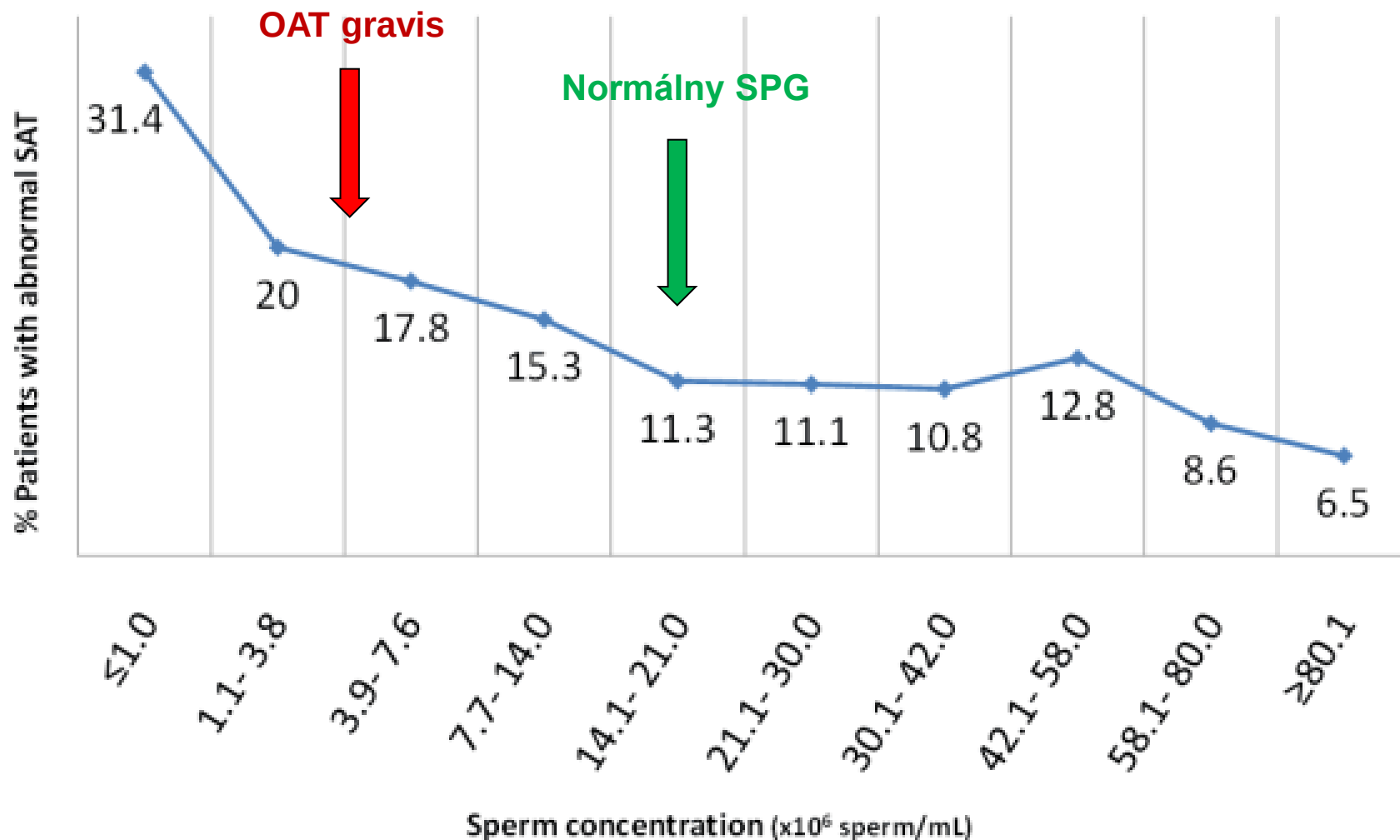
Fyziologická hladina aneuploidií

0,2% aneuploidie na chromozóm

4 - 6% aneuploidií na genóm



Koncentrácia spermií a hladina aneuploidie chromozómov

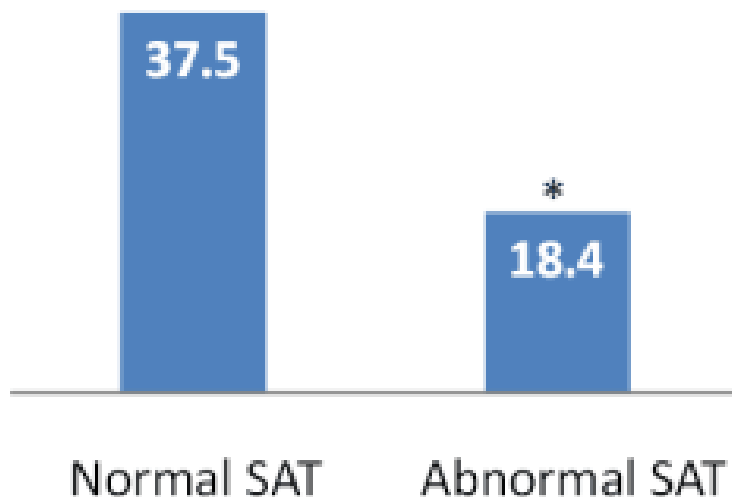


Unpublished IVI data

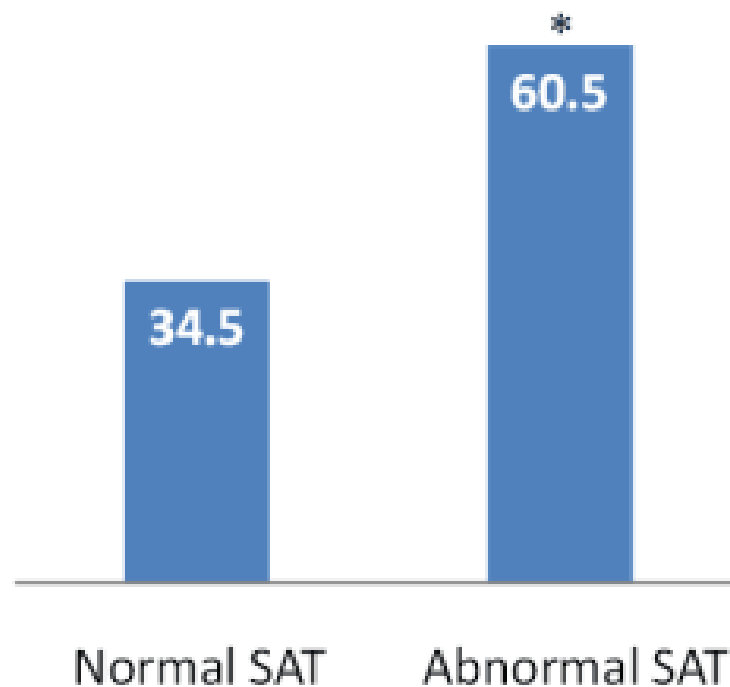


Vplyv aneuploidie spermií na úspešnosť IVF a incidenciu spontánnych potratov

Pregnancy rate/T

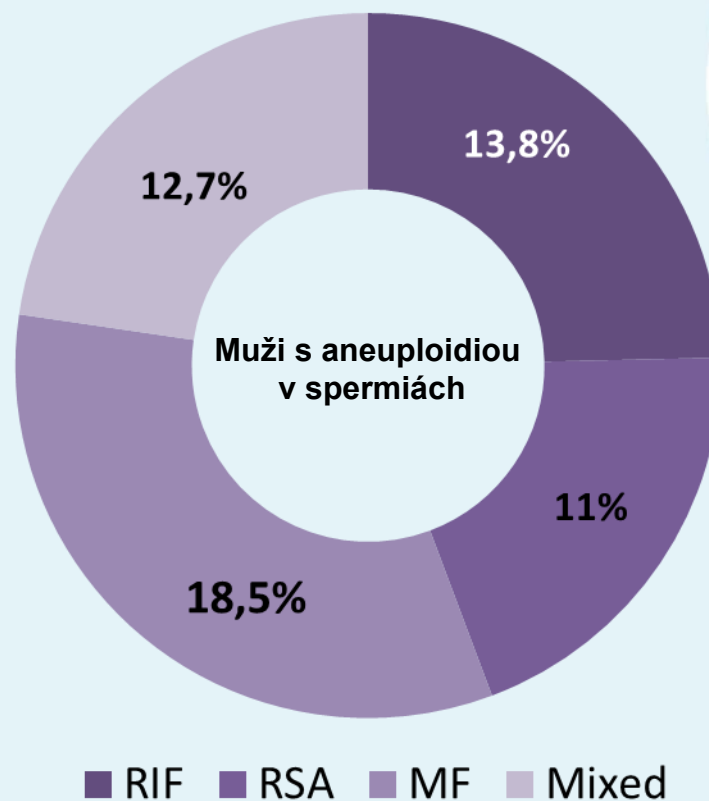
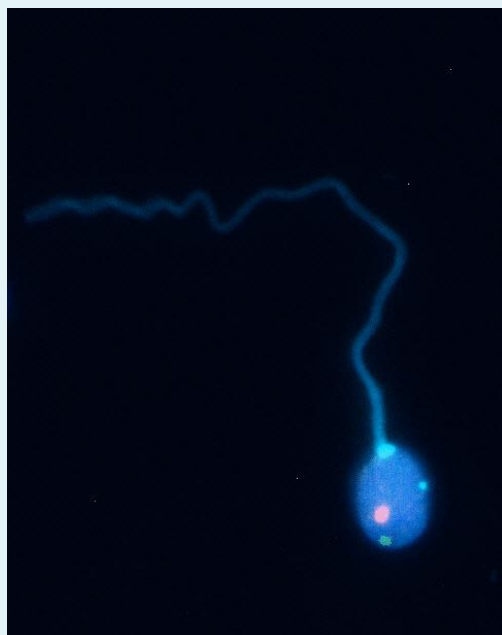


Miscarriage rate



IVF/ICSI cycles; * $P < 0.05$; Normal SAT vs. abnormal SAT. *Rodrigo et al., 2013*

Percentuálne zastúpenie pacientov s aneuploidiou v spermiách podľa indikácie



60%

gravidít sa potráca u párov s abnormálnou hladinou aneuploidie v spermiách



Prejavy aneuploidie v spermiách



Embryá:	aneuploidia embryí triploidia embryí
Gravidity:	zníženie PR (úspešnosti) IVF-ICSI zvýšená frekvencia spontánnych potratov
Narodené deti:	zvýšenie rizika narodenia potomstva s aneuploidiou



Identifikácia mužov s nízkou reprodukčnou úspešnosťou



Personalizovaná genetická konzultácia infertilného páru vzhľadom k IVF liečbe

Preimplantačná genetická diagnostika s cieľom

- zvýšenia úspešnosti (PR)
- zníženia rizika spontánneho potratu



Indikácie - AneuSperm

Muži s OAT

+

Muži s normálnym SPG



Opakovane neúspešné IVF cykly: neoplodené oocyty
nedeliace sa embryá
fragmentácia embryí
bez klinickej gravidity

Opakované spontánne potraty s normálnym karyotypom partnerov

Expozícia chemickými látkami/liekom

Chemoterapia, rádioterapia

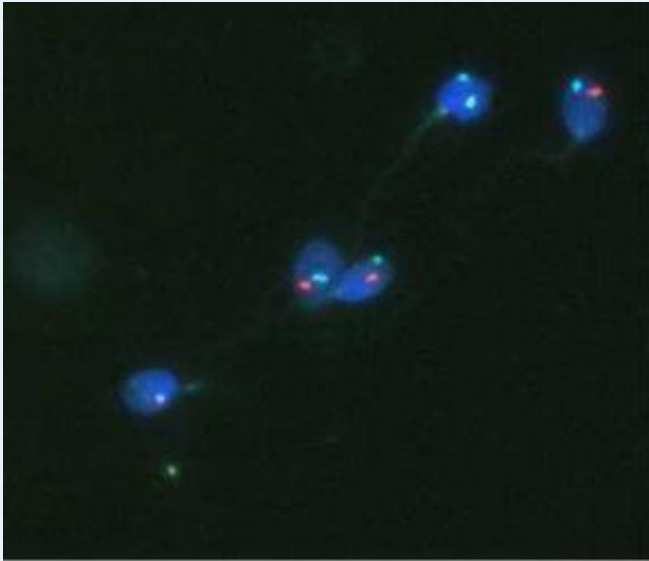


Preimplantačná genetická diagnostika

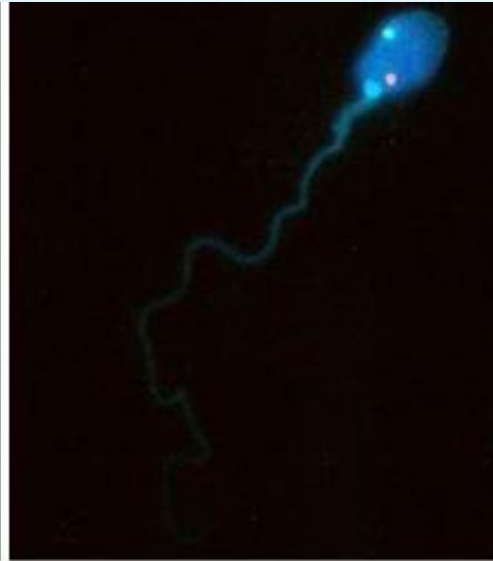
Darcovstvo spermií



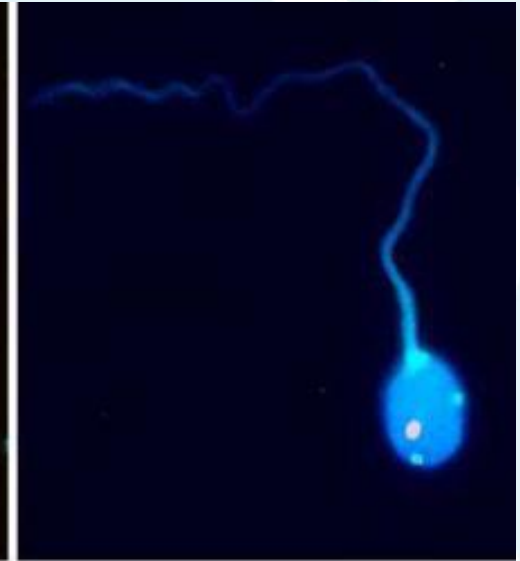
AneuSperm



normálne haploidné spermie -
1x chromozóm X alebo Y a
jedenkrát chromozóm 18



patologická spermia
obsahujúca
gonozómový
komplement XY a
jeden chromozóm 18



patologická
diploidná spermia
s chromozómami X,
Y a dvoma
chromozómami 18

Fyziologická hladina aneuploidií
~ 0,2% aneuploidií na chromozóm
4-6% aneuploidií na genóm

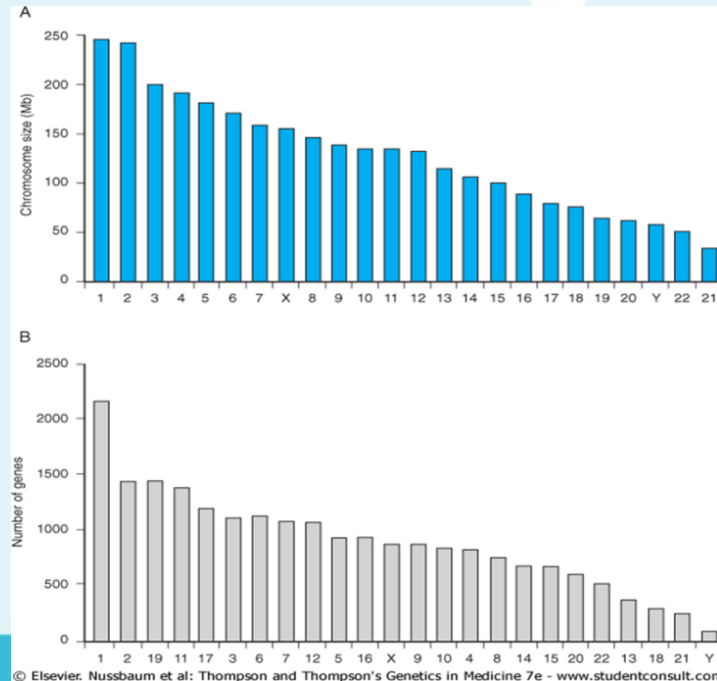
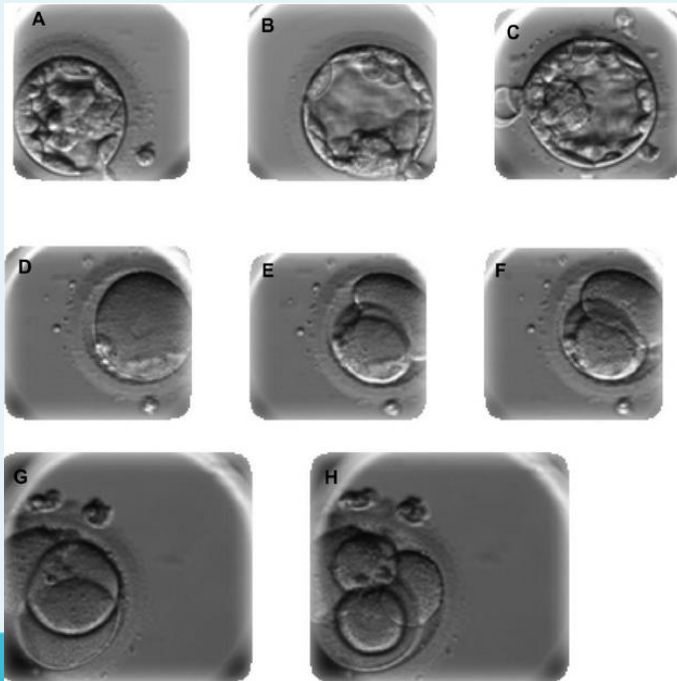
2 - 3x mierne zvýšenie (15%)
4 - 8x stredné zvýšenie (40%)
> 8x vysoké zvýšenie (>40%)

Vyšetruje sa 1000 - 2000 spermií na chromozómy 13, 18, 21, X a Y

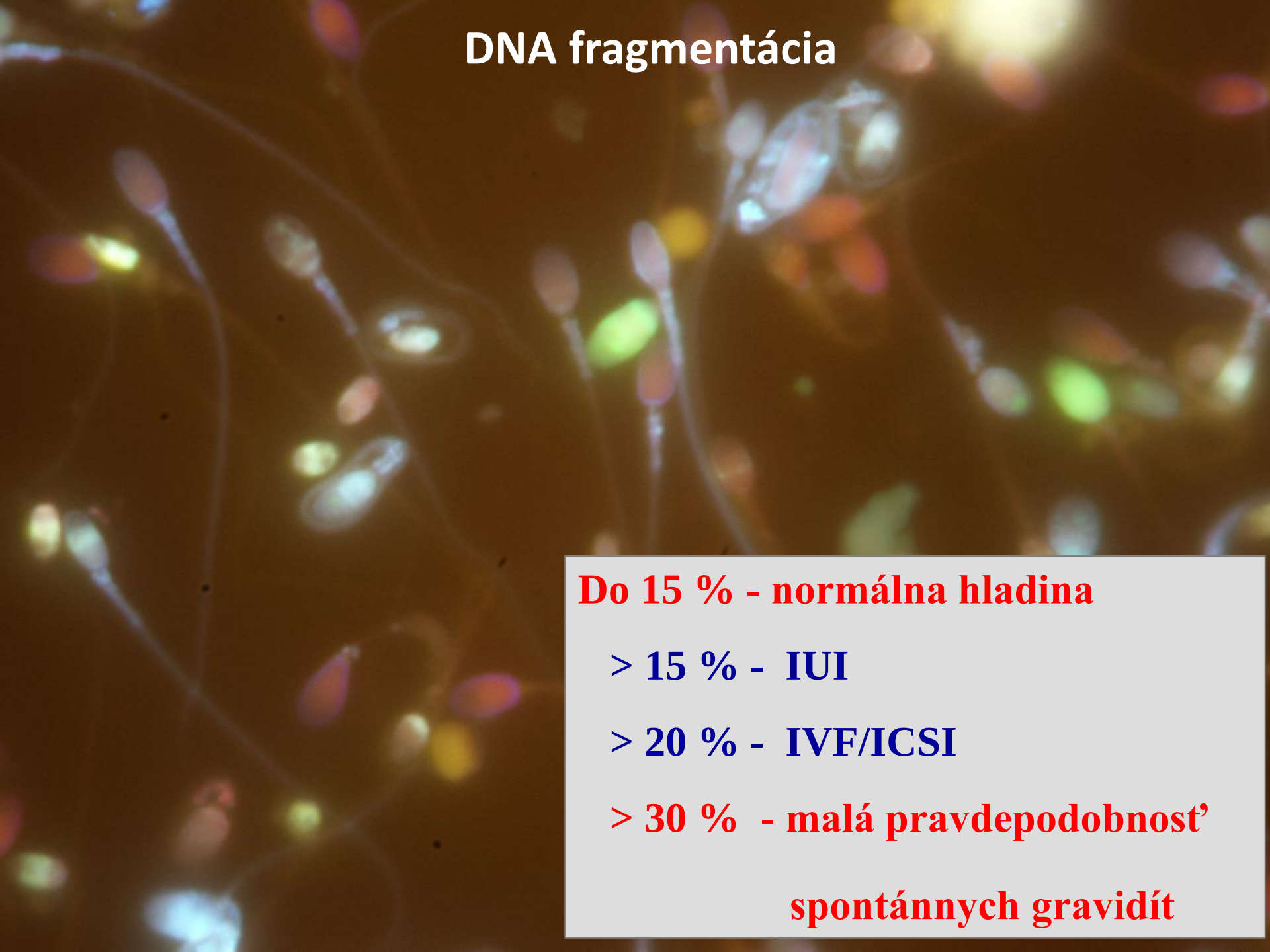


Aneuploidia embryí

- Monozómie končia vývoj do 3 dňa (8 cell stage) – okrem -21 (vývoj do blastocysty), 45,X (Turnerov syndróm)
- Trizómia +1 končí v 8 bunkovom štádiu
- Trizómia 15, 16 a 22 preživa do 1. trimestra
- Viacnásobné aneuploidie môžu mať vplyv aj na morfológiu embrya (T16,T21, X0 sa javia morfologicky ako „pekné“ embrya)
- Polyploidie 3n, 4n
- Mozaikové formy aneuploidii



DNA fragmentácia

A microscopic image showing several sperm cells. The heads of the sperm are stained with a fluorescent dye, appearing in various colors like yellow, green, and red. The tails are long and thin, extending across the field of view.

Do 15 % - normálna hladina

> 15 % - IUI

> 20 % - IVF/ICSI

> 30 % - malá pravdepodobnosť

spontánnych gravidít

Poruchy replikácie DNA - vek

Tepelný stres v skróte

Infekcia

Xenobiotiká:

- životný štýl
- terapeutická expozícia
- pracovné prostredie

Poruchy spermatogenézy:

- cytoplazmatické reziduá
- abortívna apoptóza
- aberantná protaminácia



Oxidačný stres

Tvorby DNA aduktov

Štiepenie DNA endonukleázami

Poruchy imprintingu



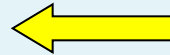
Poškodenie DNA



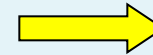
Asistovaná reprodukcia



Reparácia DNA



normálna



abnormálna

**Normálna
embryogenéza**

Abnormálny vývoj embrya

Neúspešná implantácia

Spontánne potraty

**Postihnutie detí (na úrovni
génu)**

Detské nádorové choroby



Fragmentácia DNA v spermiách

20% normospermikov má ↑ DNA fragmentáciu v spermiách

30% normospermikov má genetický defekt v spermiách

**MACS – magnetická separácia spermií
(dokáže odseparovať spermie s fragmentovanou DNA,
ale nie iné genetické defekty)**

**Na fragmentáciu spermií vplýva apoptóza, oxidačný stres
(voľné radikály), zvýšené leukocyty v ejakuláte – možná
infekcia (potrebné vyšetrenie urológom)**



Indikácie - Fragmentácia DNA v spermiách

Muži s OAT + Muži s normálnym SPG



idiopatická infertilita (normálny SPG)

opakovane neúspešné IVF cykly: neoplodnené oocyty

nedeliace sa embryá

fragmentácia embryí

bez klinickej gravidity

spontánne potraty

muži starší ako 40 rokov

expozícia toxickými látkami/liekmi

fajčiari

infekcie, zápalové ochorenia

Darcovstvo spermií, oocytov



Annexin 5

ANXA5 gén – chromozóm 4q27

4 polymorfizmy v promótoře génu:

-229G>A (rs112782763)

-210A>C (rs28717001)

-184T>C (rs28651243)

-135G>A (rs113588187)

M1 haplotyp

M2 haplotyp



N (WT) – štandardná alela

M1 haplotyp – nepatologický, bez komplikácií v tehotenstve, riziko SA nie je zvýšené

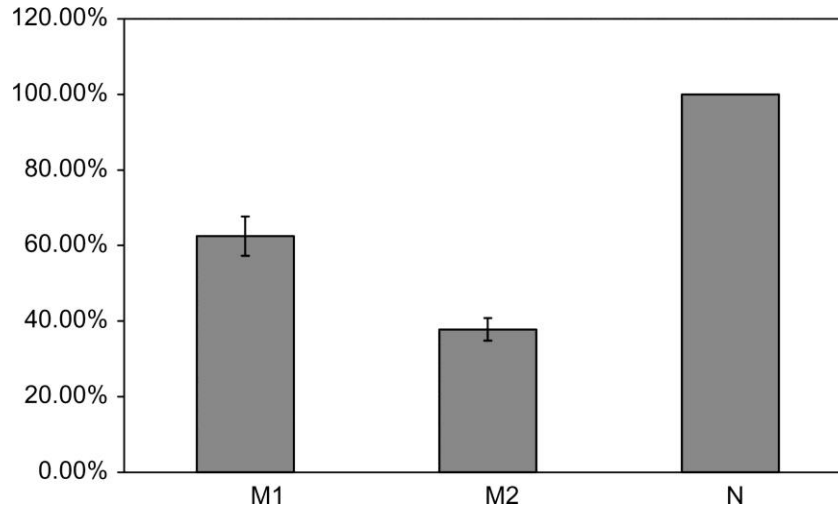
M2 haplotyp – postihnutie vaskulatúry placenty, venózný tromboembolizmus,
4x zvýšené riziko Sab, IUGR a intrauterinného odumretia plodu,
gestačnej hypertenzie, preeklampsie

M2/M2 haplotyp u plodu – môže nastať veľmi ťažká IUGR



Annexin 5

Activity of ANXA5 gene promoter variants in luciferase reporter gene assays.



Nadia Bogdanova et al. Hum. Mol. Genet. 2007;16:573-578

© The Author 2007. Published by Oxford University Press. All rights reserved. For Permissions, please email: journals.permissions@oxfordjournals.org

Human
Molecular Genetics

**PLOD NESIE RIZIKO, AK ZDEDÍ ASPOŇ 1 ALELU
BUĎ OD MATKY ALEBO OD OTCA**

**Muž nemá riziko sám pre seba, ani žena, ak nie je
tehotná!**

Genotypy: WT/WT

WT/M1

M1/M1

WT/M2 alebo M1/M2

M2/M2

Výskyt:

44%

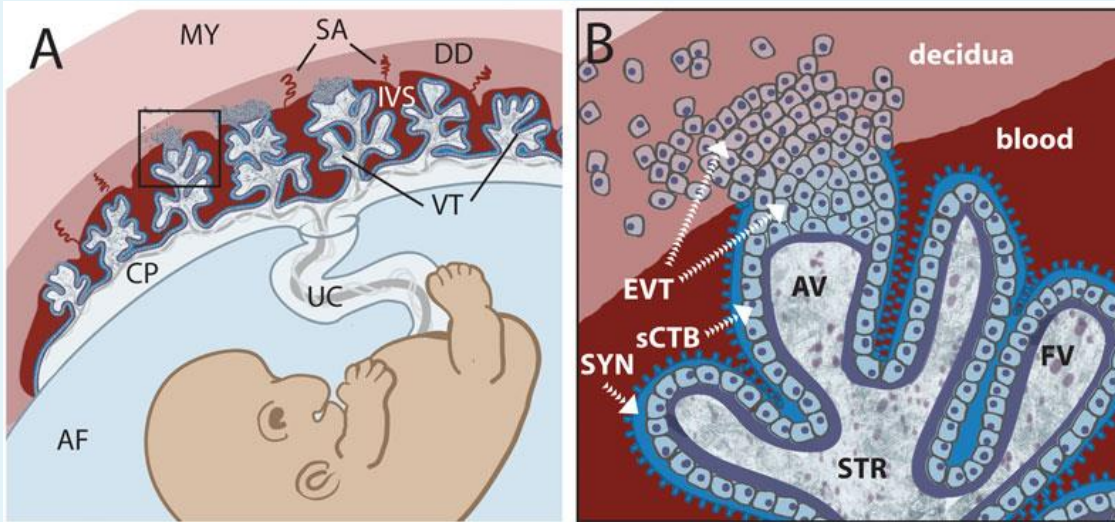
**IVF pacientov má
M2 haplotyp (ale
len 15% vo všeobecnej
ľuď je M2/M2**

6%

- Idiopatická neplodnosť – 37%
- Opakované SAb
- OAT - 40%
- PCOS – 35%
- Znížená ovariálna rezerva



Annexin 5



Čo vyšetrovať?

- Periférnu
- krv/ster z bukálnej sliznice

Ako?

- Genetickým vyšetrením
- NIE IMUNOLOGICKÝM!

Liečba – nízkomolekulárny heparín

NIE ASPIRÍN!

od dňa ET – celé tehotenstvo - po koniec šestonedelia



Záver

- Identifikácia M2 prenášačov umožňuje personalizovanú a cielenú preskripciu heparínu - LMWH (pacienti IVF centra, darcovia gamet)
- Liečba M2 prenášačov prináša 38% podiel živonarodených detí – porovnateľný s live-birth rate u neprenášačov
- Vzhľadom na:
 - vysoký výskyt vo všeobecnej populácii (15%) a u pacientov IVF centier (44%)
 - vysoké riziko habituálneho potrávania (2,4 - 4%)
 - typ dedičnosti (AD)odporúča sa genetické vyšetrenie M2 haplotyp v *ANXA5* géne u párov pred IVF ako aj u darcov gamet



Laboratórne genetické vyšetrenia u párov s opakovanými spontánnymi potratmi

Čo?	U koho?	Materiál
Karyotyp	Obaja partneri	Periférna krv
Annexin	Obaja partneri	Periférna krv/ster z bukál. sliznice
Trombofilné mutácie FV, FII	Žena	Periférna krv/ster z bukál. sliznice
DNA fragmentácia	Muž	Spermie
Aneuploidie chromozómov	muž	Spermie



Ďakujeme za pozornosť