

SPIS TREŚCI (CONTENTS)

SPIS SKRÓTÓW	7	II. ZAŁOŻENIA I CEL PRACY	29
STRESZCZENIE	9	III. MATERIAŁ I METODY	30
SUMMARY	11	1. Materiał biologiczny	30
I. WSTĘP	13	1.1. Plemniki	30
1. Organizacja chromatyny w ludzkim plemniku	13	1.2. Krew obwodowa	30
1.1. Białka chromatyny plemnika	13	1.3. Oocyty chomika	31
1.2. Model struktury chromatyny plemnika	15	1.3.1. Zezwolenie na prowadzenie doświadczeń na zwierzętach	31
1.3. Model wewnątrzjądrowej topologii chromosomów plemnika	15	2. Metody	31
1.3.1. Lokalizacja centromerów i telomerów	15	Bufory i płyny hodowlane	31
1.3.2. Terytoria chromosomów	16	2.1. Badanie kariotypu somatycznego	31
2. Aberracje chromosomów w limfocytach krwi obwodowej u nieplodnych mężczyzn	18	2.1.1. Hodowla leukocytów krwi obwodowej	31
2.1. Mężczyźni z niepłodnością idiopatyczną (normozoospermią)	18	2.1.2. Otrzymywanie preparatów i barwienie chromosomów	31
2.2. Mężczyźni z zaburzeniami spermatogenezy	18	2.2. Ksenogeniczna penetracja ludzkich plemników do oocytów chomika	32
2.2.1. Nosiciele aberracji liczby i struktury chromosomów X lub Y	19	2.2.1. Przygotowanie plemników	32
2.2.1.a. Mikrodelecje w chromosomie Y	20	2.2.2. Przygotowanie oocytów chomika i inkubacja z plemnikami	32
3. Zaburzenia w mejozie u mężczyzn	21	2.2.3. Ocena penetracji plemników (test SP)	32
4. Chromosomy plemników u płodnych mężczyzn	22	2.2.4. Otrzymywanie preparatów chromosomów plemnika w metafazie	32
5. Chromosomy plemników u nieplodnych mężczyzn o prawidłowym kariotypie somatycznym	23	2.3. Fluorescencyjna hybrydyzacja <i>in situ</i> – FISH	33
5.1. Chromosomy plemników u mężczyzn z zaburzeniami spermatogenezy	24	2.3.1. Przygotowanie preparatów	33
6. Chromosomy plemników u nosicieli aberracji chromosomowych	24	2.3.2. Wybór sond do hybrydyzacji	34
6.1. Segregacja meiotyczna chromosomów w plemnikach u nosicieli translokacji	24	2.3.3. Warunki denaturacji i hybrydyzacji	34
6.1.1. Translokacje wzajemne	24	2.4. Analiza mikroskopowa	34
6.1.2. Translokacje robertsonowskie	26	2.5. Ocena seminologiczna	35
6.2. Chromosomy plemników u nosicieli inwersji	26	2.6. Graficzna wizualizacja wyników pozycjonowania centromerów	35
6.2.1. Nosiciele inwersji pericentrycznych	26	2.6.1. Lokalizacja liniowa	35
6.2.2. Nosiciele inwersji paracentrycznych	27	2.6.2. Lokalizacja radialna	35
6.3. Chromosomy plemników u nosicieli aberracji liczby i struktury chromosomów X lub Y	27	2.7. Analiza statystyczna wyników	36
6.3.1. Chromosomy plemników u mężczyzn z delecjami chromosomu Y	27	IV. WYNIKI	36
6.4. Chromosomy markerowe a męska niepłodność	28	1. Wyniki testu penetracji plemników (SPA) i analizy kariotypów somatycznych	36
6.5. Zaburzenia w mejozie a niepłodność – hipotezy i spekulacje	28	1.1. Wyniki testu SPA i analizy kariotypów u mężczyzn z grupy kontrolnej	36
		1.2. Wyniki testu SPA i analizy kariotypów u mężczyzn z prawidłowymi cechami nasienia (w parach małżeńskich z niepłodnością idiopatyczną)	37

(cd. na stronie 3 okładki)

(cd. ze strony 4 okładki)

1.3. Wyniki testu SPA i analizy kariotypów u mężczyzn z zaburzeniami spermatogenezy	40	4.2. Lokalizacja radialna	67
1.4. Wyniki testu SPA a wyniki zapłodnień techniką <i>in vitro</i>	44	4.2.1. Plemniki mężczyzn z grupy kontrolnej	67
2. Wyniki analizy chromosomów plemników	44	4.2.2. Plemniki nosicielei translokacji chromosomowych wzajemnych	67
2.1. Analiza występowania aneuploidii w limfocytach i plemnikach	44	4.2.3. Plemniki mężczyzn z niepowodzeniami rozrodu	71
2.1.1. Chromosomy plemników barwione metodą GTG ...	49	4.2.4. Międzyosobnicze różnice w radialnej lokalizacji centromerów	73
2.2. Segregacja mejozy chromosomu markerowego ...	50	4.2.5. Wzajemna lokalizacja regionów subtelomerych ramion p i q chromosomów X oraz Y	74
3. Wzory segregacji mejozy u nosicielei translokacji chromosomowych wzajemnych	52	V. DYKUSJA	75
4. Wyniki analizy topologii chromosomów w jądrze komórkowym plemnika	60	1. Badanie potencjalnej zdolności plemników do zapłodnienia w powiązaniu z kariotypem somatycznym oraz podstawowymi parametrami nasienia	76
4.1. Lokalizacja liniowa	60	2. Badanie wpływu mitotycznej niestabilności na poziom aneuploidii chromosomów w plemnikach	79
4.1.1. Plemniki mężczyzn z grupy kontrolnej	60	3. Badanie wzoru segregacji mejozy u nosicielei translokacji chromosomowych wzajemnych	82
4.1.2. Plemniki nosicielei translokacji chromosomowych wzajemnych	60	4. Badanie topologii chromosomów w plemniku	85
4.1.3. Plemniki mężczyzn z niepowodzeniami rozrodu ..	60	VI. PODSUMOWANIE WYNIKÓW	89
4.1.4. Plemniki z hiperhaploidią	61	VII. PIŚMIENNICTWO	89
4.1.5. Plemniki frakcjonowane	61		



Instytut Genetyki Człowieka
Polskiej Akademii Nauk

Ewa Wiland

**Badania cytogenetyczne
plemników i komórek somatycznych mężczyzn
z niepowodzeniami rozrodu**

*Cytogenetic studies
of spermatozoa and somatic cells of men
with reproductive failure*

Monografia
wykonana w Instytucie Genetyki Człowieka Polskiej Akademii Nauk w Poznaniu

Poznań 2010

Recenzenci

prof. dr hab. n. med. Maciej Kurpisz

doc. dr hab. Ewa Ziętkiewicz

Redaktor Naukowy

prof. dr hab. Marian Grzymiśławski

Niniejsza monografia stanowi podsumowanie aktualnych poglądów i badań dotyczących chromosomów ludzkiego plemnika. Jednocześnie, w swym założeniu, jest podsumowaniem dekady badań własnych w tym temacie, choć są one tylko kamykiem w morzu doświadczeń prowadzonych obecnie na świecie w tematyce męskiej niepłodności.

Praca ta nie powstałaby bez życzliwości wielu osób, którym jestem winna serdeczne podziękowania.

W szczególności dziękuję Panu Profesorowi Maciejowi Kurpiszowi, który w kierowanym przez siebie Zakładzie Biologii Rozrodu i Komórek Macierzystych Instytutu Genetyki Człowieka PAN w Poznaniu, stworzył doskonałe warunki do prowadzenia badań naukowych.

Pani Profesor Alinie T. Midro, Kierownikowi Zakładu Genetyki Klinicznej Akademii Medycznej w Białymstoku, wyrażam wdzięczność za możliwość współpracy dotyczącej translokacji chromosomowych.

Panu Profesorowi Jerzemu Nowakowi, Dyrektorowi Instytutu Genetyki Człowieka PAN w Poznaniu, dziękuję za okazane mi wsparcie.

Koleżankom i Kolegom z Instytutu Genetyki Człowieka PAN, z którymi współpraca lub dyskusje były pomocne dla mojej pracy, chcę złożyć wyrazy podziękowania osobiście.

*Pracę dedykuję Pacjentom, którym niniejszym składam
podziękowanie za współdziałanie i jednocześnie życzę,
aby ich Marzenie jak najszybciej pojawiło się na świecie*

SPIS SKRÓTÓW

- A** – asthenozoospermia (asthenozoospermia)
- AZF** – region długiego ramienia chromosomu Y (azoospermia factors)
- BSA** – albumina surowicy bydłej (bovine serum albumine)
- BWW** – medium hodowlane (Biggers-Whitten-Whittingham)
- CBG** – metoda otrzymywania prążków C na chromosomach (wodorotlenek baru – Giemza)
- CENP-A** – centromerowe białko A (centromere protein A)
- CO₂** – dwutlenek węgla (carboxy dioxide)
- CRE** – czynnik transkrypcyjny zależny od cAMP (cAMP-response element)
- CES** – zespoły „kociego oka” (cat-eye syndroms)
- CT** – terytorium chromosomu (chromosome territory)
- Da** – daltony
- DAPI** – 4,6-diamidyno-2-fenylindol (4,6-diamidino-2-phenylindole)
- DDT** – ditiotreitol (odczynnik Clelanda)
- der** – np. der(20) nieprawidłowy chromosom pochodny chromosomowi 20 (derivative)
- dup** – duplikacja (duplication)
- DNA** – kwas deoksyrybonukleinowy (deoxyrybonucleic acid)
- FCS** – surowica płodowa cielęca (fetal calf serum)
- FISH** – fluorescencyjna hybrydyzacja *in situ* (fluorescent hybridization *in situ*)
- FITC** – izotiocyanian fluoresceiny
- g** – siła grawitacji
- GTG** – metoda otrzymywania prążków G na chromosomach (Giemza-trypsyna)
- H** – histony
- HCG** – ludzka gonadotropina kosmówkowa (human chorionic gonadotropin)
- HILS1** – wariant histonu swoisty dla spermatyd (histone H1-like protein in spermatids)
- HP1β** – białko HP1β zasocjowane z heterochromatyną (heterochromatin protein 1β)
- HSA** – albumina surowicy ludzkiej (human serum albumin)
- i** – izochromosom (isochromosome)
- ICSI** – docytoplazmatyczne wstrzyknięcie plemnika (intracytoplasmic sperm injection)
- inv** – inwersja (inversion)
- ISCN** – Międzynarodowy System Nazewnictwa Cytogenetycznego (International System for Human Cytogenetic Nomenclature)
- IVF** – zapłodnienie techniką *in vitro* (*in vitro* fertilization)
- LF** – liofilizat z ekstraktu fasoli *Phaseolus vulgaris*
- MI, MII** – pierwszy i drugi podział mejotyczny
- mar** – chromosom markerowy (marker chromosome)
- MAR** – rejon połączenia DNA z macierzą jądrową (matrix associated region)
- min.** – minuty
- Mpz** – mega par zasad
- O** – oligozoospermia (oligozoospermia)
- p** – ramię krótkie chromosomu (fr. petit)

- P1, P2** – protamina 1 i 2 (protamine 1 and 2)
- PKA** – kinaza białkowa A zależna od cAMP (cAMP-dependent protein kinase A)
- PKS** – zespół Pallistera Killiana (Pallister-Killian syndrome)
- PMSG** – gonadotropina osoczowa ciężarnych klaczy (pregnant mare serum gonadotropin)
- q** – ramię długie chromosomu
- RT** – translokacja robertsonowska (Robertsonian translocation)
- Ser** – seryna (Serine)
- SPA** – test penetracji oocytów chomika przez ludzkie plemniki (sperm penetration assay)
- SSC** – bufor cytrynianowy (chlorek sodu + cytrynian sodu)
- T** – teratozoospermia (terathozoospermia)
- TCW** – translokacje chromosomowe wzajemne (reciprocal translocation)
- Thr** – treonina (Threonine)
- TLF** – czynnik transkrypcji podobny do czynnika TBP wiążącego się z kasetą TATA (TBP-like factor)
- TP** – białka przejściowe (transition proteins)
- TTY** – bufor z żółtkiem jaja kurzego (TES-TRIS-yolk)
- Tween 20** – polioksyetylenosorbitan
- UV** – światło ultrafioletowe (tu: w mikroskopie fluorescencyjnym)

Streszczenie

Wstęp. W monografii przedstawiono aktualny stan wiedzy wynikającej z badań cytogenetycznych dotyczących chromosomów komórek somatycznych oraz chromosomów plemników u mężczyzn z niepowodzeniami rozrodu. Szacuje się, że anomalie cytogenetyczne mogą stanowić przyczynę niepowodzeń rozrodu w minimum 10% przypadków męskiej niepłodności. Częstość wykrywanych aberracji chromosomów w limfocytach krwi obwodowej wynosi wśród niepłodnych mężczyzn z normozoospermią około 3% (w populacji kontrolnej około 0,7%), wśród mężczyzn z zaburzeniami spermatogenezy około 7%, natomiast wśród mężczyzn z azoospermią 13,2%. U zdrowych, płodnych mężczyzn o prawidłowym kariotypie somatycznym, podział mejozytyczny może przebiegać nieprawidłowo nawet w kilku procentach spermatocytów. Konsekwencją tych zaburzeń może być zarówno utrata komórek mejozytycznych, prowadząca do azoo- lub oligozoospermii, jak również błędy w segregacji chromosomów, powodujące aneuploidie chromosomów plemnikowych. Ojcowskie pochodzenie ma ponad 50% przypadków trisomii chromosomów X lub Y i około 30% trisomii autosomów.

W etiologii niepowodzeń rozrodu zjawisku podwyższonej częstości aneuploidii w plemnikach przypisuje się dużą rolę, gdyż może być jednym z wykładników zaburzonego procesu spermatogenezy. Natomiast wydaje się, iż prawdopodobnie nie występują proste korelacje pomiędzy średnią częstością i typem aberracji chromosomów w plemnikach a określonym typem niepłodności. Prawdopodobnie brak również takiej korelacji pomiędzy kariotypem pojedynczego plemnika a jego morfologią i/lub ruchliwością. U młodych, płodnych mężczyzn odsetek plemników, w których wykrywa się aberrację liczby i/lub struktury któregoś z chromosomów zawiera się w przedziale od kilku do kilkunastu procent. Przyczyny tych indywidualnych różnic są niejasne. We wszystkich badanych grupach mężczyzn o prawidłowym kariotypie somatycznym, ale z niepowodzeniami rozrodu, częstość aberracji chromosomów w plemnikach była istotnie wyższa w porównaniu do grup kontrolnych. Dane literaturowe dotyczą także chromosomów w plemnikach fenotypowo normalnych nosicieli aberracji struktury lub liczby chromosomów wykrytych w komórkach somatycznych. Dotychczas analizowano wpływ nosicielstwa określonej aberracji na powstawanie niezrównoważonych genetycznie plemników u blisko trzystu nosicieli różnych aberracji. Najwięcej danych dotyczy segregacji mejozytycznej u heterozygotycznych nosicieli translokacji chromosomowych wzajemnych; wzór segregacji analizowano u około 140 nosicieli. Wiadomo, że powstawanie niezrównoważenia genetycznego podczas mejozy jest wysoce zmienne w różnych translokacjach i zawiera się w przedziale od około 23% do 80% (średnia ponad 50%). Sugeruje się, że niepowodzenia rozrodu typowe dla nosicieli translokacji, to znaczy wynikające głównie z eliminacji niezrównoważonych genetycznie zarodków i z poronień samoistnych, są konsekwencją braku przygotowanej selekcji plemników z nieprawidłowym genotypem. Analiza chromosomów w plemnikach dostarcza informacji o tych strukturalnych i liczbowych aberracjach, które uniknęły wyeliminowania w trakcie mejozy. Chromatyna w plemniku jest wysoce skondensowana i upakowana w 23 nukleoprotaminowe chromosomy, różniące się w istotny sposób od chromosomów komórki somatycznej składem cząsteczek, strukturą i, oczywiście, funkcją. Finalnie ukształtowane jądro plemnika stanowi tylko około 5% objętości jądra diploidalnej komórki somatycznej. Dane literaturowe z kilku ostatnich lat dostarczyły nowych informacji o specyficznej architekturze jądra plemnika. Wiadomo, że centromery chromosomów plemnika są skierowane do wnętrza jądra komórkowego, gdzie grupują się tworząc wyodrębniony obszar zwany „chromocentrum”. Natomiast telomery ramion p oraz q tego samego chromosomu tworzą dimery umiejscowione peryferyjnie. Funkcjonalne znaczenie tej swoistej topologii jest dopiero w trakcie poznawania. Sugeruje się jednak, że taka topologia może być istotna do prawidłowego ukształtowania się przedjądra męskiego, a w konsekwencji, prawidłowego rozwoju zygoty.

Cel badań. W monografii przedstawiono badania własne dotyczące pośrednio oraz bezpośrednio chromosomów w plemnikach mężczyzn z niepowodzeniami rozrodu. Celem badań była: I. Ocena zdolności plemników do zapłodnienia w powiązaniu z analizą cytogenetyczną oraz podstawowymi parametrami nasienia. II. Analiza wpływu mitotycznej niestabilności na spermatogenezę. III. Określenie związku pomiędzy wzorem segregacji mejozytycznej chromosomów plemnikowych u nosicieli translokacji wzajemnych (zrównoważonych) a niepowodzeniami rozrodu. IV. Odpowiedź na pytanie, czy zaburzonej spermatogenezie towarzyszą zmiany w wewnątrzjądrowej topologii chromosomów plemnikowych.

Materiał biologiczny. Plemniki, krew obwodowa, oocyty chemiczne.

Metody. Badanie kariotypu somatycznego: ocena ksenogenicznej penetracji plemników do oocytów chemicznych (test SPA), otrzymywanie preparatów chromosomów plemnika, fluorescencyjna hybrydyzacja *in situ* – FISH, wizualizacja wyników pozycjonowania centromerów chromosomów w jądrze plemnika: lokalizacja liniowa oraz lokalizacja radialna.

Dokumentacja. Grupa kontrolna: 23 mężczyzn w wieku od 23 do 40 lat, kariotypie 46,XY, o prawidłowych cechach ejakulatu, o potwierdzonym ojcostwie. Pacjenci: 74 mężczyzn należących do par małżeńskich z niepłodnością idiopatyczną (z prawidłową liczbą, ruchliwością i morfologią plemników), 110 mężczyzn z zaburzeniami spermatogenezy (oligo-, astheno-, teratozoospermią (20 z azoospermią). U 23 mężczyzn badano hiperhaploidie chromosomów 13, 15, 18, 21, X i Y metodą FISH. U 9 nosicieli translokacji chromosomowych wzajemnych badano wzory segregacji mejozytycznej. U 15 mężczyzn badano topologię chromosomów w plemnikach. W monografii przedstawiono 33 tabele, 26 rycin, cytowano 439 pozycji literaturowych.

Wyniki. Do realizacji pierwszego celu badań (I) zastosowano test *in vitro* ksenogenicznej penetracji plemników do oocytów chemicznych (test SPA). Średnia wartość testu SPA w grupie kontrolnej wynosiła 60%. Wykazano, że u 70% pacjentów z normozoospermią nie zachodziła negatywna selekcja na etapie penetracji plemników do oocytów *in vitro*. U 71% pacjentów z tej grupy stwierdzono kariotyp 46,XY, u 9% wykryto heteromorfizmy (warianty struktury), a chromosomy markerowe u 12%. Z kolei u około połowy pacjentów z obniżonymi parametrami nasienia obserwowano upośledzenie potencjalnej zdolności plemników do penetracji oocytów *in vitro*, jednak bez jednoznacznie związków z określoną wadą nasienia. U 74% pacjentów z tej grupy stwierdzono kariotyp 46,XY, u 24% wykryto heteromorfizmy. Użyte wyniki wskazują, że w pewnym stopniu na upośledzenie zdolności plemników do penetracji oocytów *in vitro* wpływ mogła mieć obecność heteromorfizmów chromosomów, w przeciwieństwie do chromosomów markerowych, których obecność takiego wpływu nie wykazywała. Cel drugi badań (II) realizowano poprzez poszukiwanie ewentualnych asocjacji pomiędzy poziomem aneuploidii chromosomów w jądrach komórek somatycznych w interfazie a podwyższonym poziomem aneuploidii chromosomów w plemnikach. W plemnikach mężczyzn z niepowodzeniami rozrodu średnia częstość disomii chromosomów 13, 15, 18, 21 i Y była istotnie wyższa, natomiast chromosomu X nie, w porównaniu z grupą kontrolną. Podobnie, średni poziom hiperhaploidii badanych chromosomów w komórkach somatycznych mężczyzn z azoospermią był ponad 3-krotnie wyższy w porównaniu z grupą kontrolną. Zaobserwowano, że podwyższona częstość hiperhaploidii chromosomów w plemnikach była pozytywnie skorelowana z częstością hiperhaploidii w komórkach somatycznych. Cel

trzeci badań (III) realizowano poprzez poznanie wzorów segregacji meiotycznej w kilku nieopisanych wcześniej translokacjach oraz porównanie wyników z danymi rodowodowymi, a w jednym przypadku także z danymi z diagnostyki przedimplantacyjnej. Stwierdzono, że w przypadku braku innych danych, informacja dotycząca odsetka niezrównoważonych plemników u danego nosiciela translokacji wzajemnej może być przydatna dla prognozy dotyczącej prawdopodobieństwa posiadania potomstwa bez wad. Porównano również wzory segregacji meiotycznej u ojca i syna, nosicieli tej samej translokacji rodzinnej i wykazano, że segregacja przebiegała według podobnego wzoru. Ponadto badano segregację meiotyczną chromosomu markerowego w przypadku kariotypu 46,XY[96]/47,XY+mar[4].fish der(20) i stwierdzono obecność chromosomu der(20) w ponad 8% plemników. Cel czwarty badań (IV) realizowano poprzez badanie pozycji centromerów wybranych chromosomów w plemnikach nosicieli translokacji chromosomowych wzajemnych, plemnikach z wysokim poziomem aneuploidii, plemnikach frakcjonowanych i u plemników odpłukanych z powierzchni oocytów. Wykazano, że obecność chromosomów z translokacją lub dodatkowych chromosomów powoduje przesunięcia w obszarze chromocentrum. Stwierdzono, że obecność chromosomów z translokacją w jądrze komórkowym plemnika zaburzała topologię chromosomów nie zaangażowanych w daną translokację. Dodatkowo pokazano, że potwierdzona dla większości chromosomów plemnikowych konformacja „wsuwki do włosów” cechuje również chromosom Y, którego telomery (p oraz q) mogą tworzyć dimery. Zaobserwowano fakt występowania istotnych różnic międzyosobniczych w topologii centromerów w obrębie chromocentrum. W przypadku chromosomu Y różnice były na tyle duże, że wskazywały na lokalizację przypadkową, w przeciwieństwie do centromeru chromosomu 7, który miał określoną, stałą pozycję.

Podsumowanie. I. Zdolność plemników do ksenogenicznej penetracji oocytów *in vitro* jest upośledzona u około połowy pacjentów z obniżonymi parametrami nasienia, jednak bez związku z określoną wadą nasienia. II. Korelacja pomiędzy błędami w segregacji chromosomów mitotycznych i meiotycznych wskazuje na zaburzenia w mechanizmie(ach) kontrolującym podziały komórkowe jako na jedną z przyczyn podwyższonego poziomu aneuploidii chromosomów w plemnikach. III. Znajomość wzoru segregacji meiotycznej w plemnikach nosiciela translokacji chromosomowej wzajemnej jest przydatna, w przypadku braku danych rodowodowych, do oceny prawdopodobieństwa posiadania potomstwa bez wad. IV. Topologia chromosomów w jądrze komórkowym plemnika ulega zmianie w wyniku nieprawidłowej mejozy, typowej dla nosicieli translokacji chromosomowych wzajemnych lub objawiającej się podwyższonym poziomem aneuploidii.

SŁOWA KLUCZOWE: aberracje chromosomowe, genotyp plemnika, męska niepłodność, test penetracji, topologia chromosomów w plemniku, translokacje chromosomowe wzajemne, wzór segregacji meiotycznej.

Summary

Introduction. The monograph presents the state of the art of cytogenetic studies of chromosomes in somatic cells and sperm cells in men with reproductive failure. It is estimated that cytogenetic anomalies may be responsible for reproductive failure in at least 10% of cases of male infertility. The discovery ratio for chromosomal aberration in lymphocytes of peripheral blood is 3% for infertile men with normozoospermia (0.7% in the control population), ca. 7% in men with spermatogenic dysfunction, and 13.2% in men with azoospermia. In healthy, fertile men with a normal somatic karyotype, the meiotic division can proceed incorrectly even in a few per cent of spermatozoa. The consequence of such disorders can be both the loss of meiotic cells, which leads to azo- or oligozoospermia, and errors in chromosome segregation, which lead to sperm chromosome aneuploidy. Over 50% of cases of the trisomy of chromosome X or Y and about 30% of autosomal trisomy have a paternal origin.

In the etiology of reproductive failures, the phenomenon of a higher aneuploidy frequency in sperm cells has been taken to be essential, since it can constitute one of the exponents of dysfunctional spermatogenesis. However, it appears that there are no direct correlations between the average frequency and type of chromosomal aberration in spermatozoa and a specific type of infertility. Probably, there is also no such correlation between the karyotype of a singleton sperm cells and its morphology and/or its mobility. In young fertile men, the percentage of spermatozoa with attested aberration of number and/or structure ranges from a few to less than 20%. The reasons for these individual variations remain unclear. In all studied groups of men with the normal somatic karyotype but with reproductive failure, the frequency of aberrations of chromosomes in spermatozoa was higher than in control groups. The data in the literature also concern chromosomes in spermatozoa of phenotypically normal carriers of the aberration of structure or the number of chromosomes attested in somatic cells. What has been analyzed so far is the influence of the carrierhood of a specific aberration on the creation of genetically unbalanced spermatozoa in almost three hundred carriers of different types of aberration. Most of the data concern meiotic segregation in heterozygotic carriers of reciprocal chromosome translocations. The segregation pattern has been analyzed in approximately 140 carriers. It is known that the creation of the unbalanced genetic balance during meiosis varies highly in different translocations and amounts to between 23% and 80% (the average is 50%). It is suggested that reproductive failures which are typical to translocation carriers and which result mostly from the elimination of genetically unbalanced embryos and spontaneous miscarriages are the consequence of the lack of prezygotic selection of spermatozoa with an incorrect genotype.

The analysis of chromosomes in spermatozoa provides information about those structural and numerical aberrations which avoided the elimination during meiosis. The chromatin in the spermatozoa is highly condensed and packed up in 23 nucleo-protamine chromosomes, which essentially differ from chromosomes of a somatic cell with respect to the composition of the particles, the structure and, obviously, the function. A fully formed spermatozoa's nucleus constitutes only about 5% of the volume of the nucleus of a diploid somatic cell. The recent literature has provided some new information about a specific architecture of the spermatozoa's nucleus. It is known that the centromeres of the spermatozoa's chromosomes are directed toward the center of the cell's nucleus, where they group to form a separate area called the chromocenter. In turn, the telomeres of arms p and q of the same chromosome form the peripherally located dimers. The function of this particular topology is currently subject to further research. It is, however, suggested that such a topology may be important for the well-formedness of the male pronucleus and, consequently, the correct development of the zygote.

Aims of the research. The monograph reports on the author's own research on chromosomes in the spermatozoa of men with reproductive failure. The aims of the research included: I. The assessment of the spermatozoa's ability to fertilize in the connection with the cytogenetic analysis and basic sperm parameters. II. The analysis of the influence of mitotic instability on spermatogenesis. III. The determination of the relation between the meiotic segregation pattern of spermatozoa's chromosomes of the carriers of reciprocal (balanced) translocations and reproductive failure. IV. The answer to the question whether a disrupted spermatogenesis is accompanied by changes in the internuclear topology of sperm chromosomes.

Biological material. Sperm cells, peripheral blood, hamster oocytes.

Methods. Examination of the somatic karyotype, xenogenic penetration of spermatozoa into hamster oocytes, the assessment of the penetration of spermatozoa into hamster oocytes; obtaining the spermatozoa's chromosomes, fluorescence *in situ* hybridization -- FISH, virtualization of the results of the positioning of chromosomes in the spermatozoid's nucleus: linear localization, radial localization

Documentation. Control group: 23 men between 23 and 40 years old, karyotype 46,XY, with correct sperm parameters and with confirmed paternity. Patients: 74 men from married couples with idiopathic infertility (with a correct number, mobility, and morphology of spermatozoa), 110 men with spermatogenesis dysfunction (oligo-, astheno-teratozoospermia (20 with azoospermia), 23 men were tested for hiperhaploidy in chromosomes 13, 15, 18, 21, X and Y with the FISH method. 9 carriers of reciprocal balanced chromosomal translocations were tested for meiotic segregation patterns. 15 men were tested for chromosomal topology in spermatozoa.

Results. I. To achieve the first aim of the research, *in vitro* assay of xenogenic penetration of spermatozoa into hamster oocytes (the SPA assay) was applied. The average value of the SPA assay in the control group was 60%. It was established that 70% of patients with normozoospermia did not exhibit a negative selection at the level of the spermatozoa's penetration into the oocytes *in vitro*. In 71% of patients in this group, karyotype 46,XY was discovered, 9% of patients had heteromorphisms (a structural variants), and marker chromosomes were found in 12% of patients. In turn, an impaired ability of the spermatozoa to penetrate the oocytes *in vitro* was observed in about half of the patients with lowered sperm parameters. Nevertheless, this was observed not to be linked to a particular impairment of the sperm. In 74% of patients from this group, karyotype 46, XY was found, and in 24% of patients, heteromorphisms were found. The results show that the spermatozoa's ability to penetrate the oocytes *in vitro*, to a certain extent, could have been influenced by the presence of chromosomal heteromorphisms but not by marker chromosomes, whose presence did not show such an influence.

II. The second aim of the study was achieved by searching probable associations between the level of chromosomal aneuploidy in somatic cells' nuclei in the interphase and a higher level of chromosomal aneuploidy in spermatozoa. In the spermatozoa of men with reproductive failure, the average frequency of the disomy of chromosomes 13, 15, 18, 21 and Y was considerably higher when compared with the control group, unlike the disomy of the chromosome X. Similarly, the average level of hiperhaploidy in the somatic cells of the studies chromosomes in men with azoospermia was over 3 times higher when compared with the control group. It was observed that a higher frequency of chromosomal hiperhaploidy in spermatozoa was positively correlated with with the frequency of hiperhaploidy in somatic cells.

III. The third aim was achieved by the recognition of meiotic segregation patterns in a few previously unrecognized reciprocal translocations and by comparing the results with the pedigree data, and, in one case, with the preimplantation data. It was established that in the case of other relevant data, the information about the ratio of unbalanced spermatozoa in a reciprocal translocation carrier can be helpful in the prognosis of having defectless offsprings. Meiotic segregation patterns in the father and son who were the carriers of the same familial translocation were also compared and it was discovered that the segregation proceeded according to the identical pattern. Moreover, the meiotic segregation of the marker chromosome in the case of 46,XY[96]/47,XY+mar[4].fish der(20) was studied and the presence of the chromosome der(20) in over 8% of spermatozoa was observed.

IV. The fourth aim was achieved by investigating the positions of centromeres of selected chromosomes in spermatozooids of the carriers of the reciprocal balanced chromosomal translocation, spermatozoa with a high aneuploidy level, spermatozoa after 'swim up', and spermatozoa washed off the surface of the oocytes. It was discovered that the presence of the chromosomes with a translocation or additional chromosomes caused changes in the chromocenter area. It was established that the presence of the chromosomes with a translocation in the spermatozoid's nucleus also disturbed the topology of chromosomes which were not involved in a given translocation. It was additionally showed that the established hairpin conformation is also characteristic of the chromosome Y, whose telomers (p and q) can form dimers. The presence of considerable interindividual differences in the topology of centromeres within the chromocenter was observed. In the case of chromosome Y, the differences were considerable enough to indicate a random localization, contrary to what was observed in the case the chromosome 7, which had a defined position.

Conclusion. I. The ability of spermatozoa a xenogenic penetration of the oocytes *in vitro* was impaired in about half of the patients with lowered sperm parametrs but with no connection to a particular defect of the sperm. II. The correlation between the errors in the segregation of mitotic and meiotic chromosomes indicated that the defects in the mechanism(s) controlling cellular divisions are one of the reasons of a higher level of chromosomal aneuploidy in spermatozoids. III. The knowledge of the meiotic segregation pattern in the spermatozoa of a reciprocal chromosomaltranslocation carrier is useful for the prognosis of having defectless offsprings in the case of the lack of the pedigree data. IV. The chromosomal topology in the spermatozoid's nucleus changes as a result of an incorrect meiosis, which is typical for reciprocal chromosomal translocation carriers, or which is indicated by a higher level of aneuploidy.

KEY WORDS: chromosome aberrations, male infertility, meiotic segregation pattern, reciprocal chromosomal translocations, SPA, sperm genotype, topology of chromosomes in sperm.

I. WSTĘP

Badania w krajach wysoko uprzemysłowionych wskazują, że u około 15% par małżeńskich w okresie rozrodczym występuje niepłodność pierwotna lub wtórna [1, 2]. Szacuje się, że w około 30–50% są to niepowodzenia rozrodu u mężczyzn [3]. W około 10–15% przypadków przyczyną są anomalie cytogenetyczne zarówno somatyczne, jak i meiotyczne [4].

1. Organizacja chromatyny w ludzkim plemniku

Plemniki tradycyjnie są uważane za biologicznych „darczyńców”, których jedyną funkcją jest dostarczenie komórce jajowej ojcowskiego genomu. Pogląd ten wynika z obserwacji, że w główce plemnika znajduje się duże jądro komórkowe, a cytoplazmatyczna część komórki jest znacznie zredukowana i nie wykazuje większości funkcji metabolicznych, typowych dla komórek somatycznych. Wykrycie w plemniku nowych makromolekuł, takich jak RNA i białka, sugeruje, że plemnik jest również nośnikiem cząsteczek ważnych dla wczesnego rozwoju embrionu [5, 6, 7]. Chromatyna haploidalnego genomu plemnika różni się od chromatyny komórki somatycznej budową, strukturą i, oczywiście, funkcją. Plemnik jest końcowym produktem spermatogenezy i właśnie w trakcie tego procesu następuje przemiana chromatyny typu somatycznego na chromatynę plemnika, maksymalnie skondensowaną i transkrypcyjnie nieaktywną. Większość biochemicznych i morfologicznych zmian, prowadzących do ukształtowania jądra komórkowego plemnika zachodzi podczas spermiogenezy, czyli haploidalnego etapu spermatogenezy. Jest to jedna z najbardziej znaczących i zarazem spektakularnych przemian znanych w biologii. Ukształtowane jądro plemnika, o wymiarach około 5–6 μm długości i 2,5–3,5 μm szerokości, stanowi tylko 5% objętości jądra diploidalnej komórki somatycznej [8]. Po fuzji plemnika z komórką jajową (oocytom), przed pierwszym mitotycznym podziałem zygoty, zachodzi proces odwrotny, to znaczy transformacja nieaktywnej chromatyny plemnika na chromatynę typu somatycznego. Transformacja ta zależna jest w znacznym stopniu od czynników obecnych w ooplazmie, natomiast rola w tym procesie jądrowych struktur plemnika jest słabo poznana [9].

Nie wiadomo, czemu ma służyć specyficzna budowa chromatyny plemnika. Nasuwa się oczywiście odpowiedź, że umożliwia ona pełnienie funkcji, jaką plemniki odgrywają w procesie zapłodnienia: 1) transportu i ochrony ojcowskiej informacji genetycznej oraz 2) zabezpieczenia chromatyny plemnika przed uszkodzeniami fizykochemicznymi. Sugeruje się, że przemiana chromatyny typu somatycznego na plemnikowy może również służyć takiemu przeprogramowaniu genomu, który zapewnia odpowiednim genom z chromosomów ojcowskich ekspresję na najwcześniejszych etapach embriogenezy. Trzeba

podkreślić, że zależność między organizacją chromatyny a funkcją plemnika jest dopiero w trakcie poznawania. Badania kilku ostatnich lat dostarczyły nowych informacji o specyficznej architekturze jądra plemnika [8, 10, 11, 12], która, podobnie do jądra komórki diploidalnej, może stanowić integralną część epigenetycznych mechanizmów przestrzennych [13, 14, 15, 16, 17, 18].

1.1. Białka chromatyny plemnika

W chromatynie dojrzałego plemnika, w porównaniu z komórkami somatycznymi, brak jest znaczących różnic jedynie na poziomie podwójnej helisy DNA. W chromatynie plemnika nukleosomy zastąpione są kompleksami DNA-protaminy, które nie są (lub tylko w minimalnym stopniu) superhelikalnie skręcone. Odmienna struktura molekularna kompleksu DNA-protaminy w plemnikach jest odpowiedzialna za różnice w organizacji chromatyny/chromosomów w porównaniu z komórkami somatycznymi [16, 19, 20, 21].

Przemiana chromatyny somatycznej w plemnikową jest kilkuetapowym procesem, który zachodzi podczas przemiany okrągłych i podłużnych spermatyd w plemniki (w trakcie spermiogenezy). Zanim dojdzie do powstania kompleksów DNA-protaminy, histony przejściowo zastępowane są przez tzw. białka przejściowe TP (transition proteins). Wstępem do zamiany somatycznych histonów przez białka przejściowe (a następnie przez protaminy) jest rozluźnienie struktury nukleosomu, poprzedzone acetylacją histonu H4 [22, 23] oraz ubikwitynacją histonów H2B i H3 [24, 25]. W chromatynie okrągłych spermatyd około 85–90% histonów zostaje zastąpionych przez białka przejściowe TP, z których najlepiej są scharakteryzowane TP1 (około 50%) i TP2 (około 40%). Białko TP1, zbudowane z 54 aminokwasów, jest bogate w argininę, lizynę i serynę [26]. Dwukrotnie większe białko TP2 zawiera na końcu karboksylowym aminokwasy zasadowe, a na końcu aminowym dwa palce cynkowe. W TP2 zarówno seryna Ser109, jak i treonina Thr101 są potencjalnymi miejscami fosforylacji poprzez cAMP-zależną kinazę białkową A (enzym PKA). Właśnie fosforylacja TP2 jest związana z mniejszą kondensacją DNA, ułatwiającą przyłączenie protamin [27]. Wraz z oddysocjowaniem większości histonów, pojawieniem się białek TP, zanikiem struktury nukleosomów i elongacją okrągłych spermatyd, w spermatydach ustaje aktywność transkrypcyjna.

W chromatynie wydłużonych spermatyd białka przejściowe TP zostają zastąpione protaminami [28]. Protaminy są zasadowymi białkami o masie cząsteczkowej od 4–12000 Da. W porównaniu z histonami, protaminy są białkami o połowę mniejszymi, z dwukrotnie większą zawartością reszt argininy (50–70%) i cysteiny. Wyróżnia się dwa typy protamin: protamina 1 (P1), występująca u prawie wszystkich ssaków [29] oraz protamina 2 (P2), obecna

u człowieka i u kilku innych gatunków [29, 30, 31, 32]. Ilość protaminy P2 w porównaniu z P1 jest gatunkowo różna: 67% u człowieka, 43% u chomika, 34% u myszy [33]. Ludzka protamina P1 (57 aminokwasów) wykazuje około 50% homologii do P2 [31]. Ewolucyjnie, protaminy wywodzą się z histonu H1 [196, 276, 306]. U płodnych mężczyzn stosunek ilościowy protaminy 1 do protaminy 2 (P1/P2) mieści się w zakresie od 0,8 do 1,2 [37]. W plemnikach nieplodnych mężczyzn opisywano zmienioną proporcję protamin P1/P2 lub brak P2 [35, 38, 39, 40, 41, 42]. Zaburzenia te mogą wynikać zarówno ze zmienionej ekspresji genów dla protamin, jak i zmian w translacji i potranslacyjnych modyfikacjach [35, 39]. Wiadomo także, że wśród nieplodnych mężczyzn częściej niż w grupach kontrolnych stwierdza się polimorfizm w promotorze genu protaminy 1 (-190 C->A) [40]. Zaburzenia dotyczące protamin korelują z obniżonymi parametrami ejakulatu i z poziomem uszkodzeń DNA w plemnikach [35, 39, 42].

Pojedyncze kopie genów ludzkich protamin P1, P2, a także białka TP2, zlokalizowane są w wielogenowym locus 16p13.13, tworząc pojedynczą domenę 28,5 kbp. Geny te zawierają jeden intron, elementy kasyety TATA oraz CRE (cAMP-response element). Transkrypcja genów protamin zachodzi z haploidalnego genomu w okrągłych spermatydach, a 2–8 dni później mRNA ulega translacji. Wkrótce po syntezie protaminy ulegają fosforylacji, ale ostateczne wbudowanie protamin do chromatyny plemnika poprzedzone jest ich defosforylacją [43, 44, 45]. Protaminy wiążą się wzdłuż fosfodiesterowego szkieletu DNA niezależnie od sekwencji nukleotydów. Jedna cząsteczka protaminy wiąże się do jednego skrętu DNA (około 11 pZ DNA). Stwierdzono, że w warunkach *in vitro* protaminy mogą wiązać się z DNA w szerszym rowku [46, 47, 48] lub zarówno w szerszym, jak i węższym rowku [49], względnie elektrostatycznie do powierzchni DNA [50]. W pierwszym modelu Balhorna z 1982 roku [51] sugerowano, że protaminy układają się wzdłuż wąskiego rowka podwójnej helisy DNA wiążąc się z nim poprzez centralną domenę, a wyeksponowane długie łańcuchy reszt argininy neutralizują ujemny ładunek fosfodiesterowego szkieletu DNA. W ten sposób polianionowy DNA ulega przekształceniu w neutralny polimer. Stabilność tego układu dodatkowo wzmacniają mostki dwusiarczkowe reszt cysteiny [52]. Wyniki uzyskane ze spektroskopii Ramana wskazują jednak, że w chromatynie plemnika protaminy wiążą się z DNA w szerszym rowku [46]. Protaminy (a także inne polikationy testowane w badaniach *in vitro*) przyłączając się do DNA powodują związanie się cząsteczki DNA w szerokie, koncentryczne kręgi, tym samym tworząc postać przypominającą szpulkę nici. Nakładające się na siebie kręgi ulegają silnej kondensacji i powstaje struktura toroidu zawierająca około 50 kbp DNA [53, 54]. Jądro plemnika ma około 50000 toroidów [55]. Doświadczenia *in vitro* nad kondensacją i dekonduacją DNA wykazały, że formowanie toroidu i jego stabilność zależy od liczby domen białkowych bogatych w reszty arginino-we. Kondensacja DNA w toroid zachodzi, gdy 90% ładunków wzdłuż cząsteczki DNA ulegnie zneutralizowaniu. Natomiast w modelu doświadczalnym dekonduacja DNA

poprzez oddysocjowanie białek postępowala w takim tempie, że odłączenie protamin od genomu plemnika ($1,5 \times 10^9$ pZ) wymagałoby około 6 lat. Faktycznie dekonduacja chromatyny plemnika *in vivo* w cytoplazmie komórki jajowej trwa od 6–10 minut, co potwierdza hipotezę, że po zapłodnieniu protaminy muszą być aktywnie usuwane z DNA [55].

W dojrzłym ludzkim plemniku około 10% DNA pozostaje związane z wariantami jądrowymi histonów [56, 57, 58, 59, 60, 61, 62]. Pewne ilości gonadowo-swoistych wariantów histonów pojawiają się już w spermatogoniach, co sugeruje, że mogą być niezbędne w procesach unikatowych dla mejozy. Większość tych wariantów jest syntetyzowana i inkorporowana do chromatyny w spermatocytach podczas mejozy [58, 59, 60]. Liczba wszystkich wariantów histonów występujących w męskich komórkach germinalnych jest niezwykle duża w porównaniu z komórkami somatycznymi [12, 61, 62]. Prawdopodobnie warianty te pełnią sygnałową rolę na poszczególnych etapach wymiany histonów na protaminy. Pierwsze wymiany histonów somatycznych na warianty gonadowe zachodzą już w diploidalnych spermatogoniach, w których histon H3 zostaje zastąpiony przez wariant TH3. Opisano jeszcze dwa inne warianty histonu H3: wariant H3.3A obecny w chromatynie do etapu różnicowania wydłużonych spermatyd oraz wariant H3.3B związany z euchromatyną spermatocytów, co sugeruje jego wpływ na regulację aktywności transkrypcyjnej [63]. Znamienny natomiast wydaje się fakt, iż obecny w centromerach chromosomów komórek somatycznych wariant histonu H3 tj. CENP-A (centromere protein A) nie jest zastępowany innym wariantem w trakcie spermiogenezy [60, 64, 65].

W spermatocytach, w stadium preleptotenu mejozy, histon H2A ulega wymianie na TH2A a histon H2B – TH2B [12, 60]. Następnie, w pachytenie, somatyczne histony H1A i H1B zastępowane są przez wariant H1t. Z kolei w okrągłych spermatydach, pojawia się wariant H1t2. Występuje on w regionie formowania akrosomu, który jest jednocześnie miejscem inicjacji kondensacji chromatyny. H1t2, ze względu na swe wysoce selektywne wewnątrzjądrowe rozmieszczenie, wydaje się równie istotny w reorganizacji chromatyny jak protaminy [66, 67]. Swoisty jedynie dla wydłużonych spermatyd jest wariant HILS1 (histone H1-like protein in spermatids) [68]. Wewnątrzjądrowa lokalizacja tego wariantu jest taka sama jak TP2 i protaminy 1 (P1), co wskazuje na jego bezpośredni związek z kondensacją chromatyny [69]. Natomiast odpowiednikiem somatycznego histonu H4 jest gonadowy histon H4.

We wczesnych okrągłych spermatydach liczba histonów zastąpionych przez ich warianty przekracza 50%, ale nadal zachowana pozostaje struktura nukleosomu i aktywność transkrypcyjna. Aktywność transkrypcyjna ustaje wraz z oddysocjowaniem histonu H1t i większości histonów (a także ich wariantów) i pojawieniem się białek przejściowych TP.

Po tak radykalnej przebudowie chromatyny, w dojrzłym plemniku pozostaje około 10–15% histonów (wariantów). Nasuwa się pytanie o ich szczegółową lokalizację

zacji i rolę. Istotne jest bowiem to, że obecność histonów oznacza możliwość utrzymania struktury nukleosomu. Z nowszych badań Hammound wynika, że dotyczy to 4% haploidalnego genomu [70]. Nukleosomy w plemniku są ściślej upakowane niż w komórkach somatycznych. Wykazano, że strukturę nukleosomów mają regiony telomerowe wszystkich chromosomów plemnikowych [11]. Charakterystyczną cechą tych nukleosomów jest obecność wariantu histonu spH2B [12, 71, 72]. Wiadomo również, że z sekwencjami centromerowymi chromosomów plemnika związane są zarówno histony, jak i protaminy [69]. Histony zawierają także obecne w DNA plemnika domeny, które wykazują wrażliwość na działanie nukleaz (egzo- i endogennych) [70, 73, 74, 75]. Sugeruje się, że z domenami tymi mogą być związane inne warianty histonów niż w regionach centromerów i telomerów [76]. W związku z tym nasuwa się sugestia, że nukleosomy w chromatynie plemnika mogą być związane z genami, które ulegają transkrypcji na najwcześniejszym etapie rozwoju zygoty [70]. Alternatywną możliwością jest założenie, że histony w chromatynie plemnika związane są ze wszystkimi specyficznymi sekwencjami kodującymi białka. Obydwie wspomniane możliwości pozostają na razie w sferze hipotez [8, 70, 73, 76, 77, 78].

1.2. Model struktury chromatyny plemnika

Przedstawiony niżej model, nazwany „the donut-loop model”, stanowi próbę opisania, w jaki sposób w plemniku u ssaków cząsteczka DNA uczestniczy w budowie chromatyny [8]. Model ten nie opisuje sekwencji procesów molekularnych, ale jest podsumowaniem poglądów na temat organizacji struktury chromatyny plemnika. Jednocześnie model „donut-loop” odpowiada takiej wizji chromatyny plemnika, w której struktura odgrywa bezpośrednią rolę w funkcji plemnika.

Na pierwszym poziomie struktury chromosomów plemnikowych, DNA jest zorganizowany na całej długości w postaci wypętlonych domen (loop domains) o długości około 50 kbp [8, 79, 80]. Domeny te ulegają zmianom w trakcie spermatogenezy [81, 82]. Wielkość tych domen jest prawie dwukrotnie mniejsza w porównaniu ze średnią wielkością domen w jądrach komórek somatycznych, przy czym to zmniejszenie nie wydaje się wynikać bezpośrednio z haploidalności genomu plemnika [80]. Każda z domen DNA w chromosomach plemnika ma u swej podstawy specyficzne sekwencje nazwane MARs (matrix attachment regions), poprzez które DNA wiąże się z macierzą jądrową, pełniącą funkcję wewnątrzjądrowego szkieletu [25, 83, 84, 85].

Model „donut-loop” zakłada, że podczas spermiogenezy pojedyncza domena DNA łącząc się z protaminami tworzy jeden toroid [8]. Znajdujące się pomiędzy toroidami sekwencje MAR tworzą odcinki łącznikowe (toroid linker regions). Odcinki łącznikowe między toroidami nie są związane z protaminami i pozostają niezmiennione w trakcie spermiogenezy [81, 86]. Sugeruje się, że te łącznikowe odcinki DNA pozostają związane z histonami (wariantami)

i mają zachowaną strukturę nukleosomów [86, 87], podobnie jak regiony telomerowe i centromerowe chromosomów plemnika [12, 60, 64, 65, 71, 72]. Taka organizacja wydaje się niezbędna do rozpoczęcia prawidłowej embriogenezy, bowiem, jak się przypuszcza, miejsca wiązania DNA z macierzą jądrową mogą być miejscami inicjacji transkrypcji i replikacji. Zatem po zapłodnieniu, domeny pełniłyby rolę funkcjonalnych podjednostek [88, 89, 90]. Wprowadzono nawet pojęcie „trójwymiarowego kodu genetycznego” dla podkreślenia, że strukturalna organizacja haploidalnego genomu plemnika dostarcza ważnych informacji epigenetycznych [89]. W doświadczeniach, w których wprowadzano do mysich oocytów jądra komórkowe plemników po wyłukaniu z nich protamin wykazano, że integralność macierzy jądrowej i związanych z nią domen DNA była niezbędnym, ale jednocześnie wystarczającym czynnikiem do replikacji DNA w przedjądrzu męskim i do wykształcenia prawidłowych chromosomów mitotycznych [88, 89]. Opisana w modelu „donut loop” strukturalna organizacja plemnikowego DNA jest stała i niezwiązana ze zmiennością morfologii plemników, obserwowaną w standardowej analizie nasienia [91].

Na podstawie modelu „donut-loop” nie można stwierdzić, w jaki sposób nukleoprotaminowe toroidy oddzielone łącznikowymi odcinkami tworzą struktury wyższego rzędu i kształtują chromosomy.

Z kolei Mudrak i wsp. [10] zaproponowali model struktur chromosomów plemnika, który powstał na podstawie analizy obrazów trójkolorowego FISH (fluorescencyjna hybrydyzacja *in situ*) z użyciem sond malujących ramiona krótkie (p) oraz długie (q) w jądrach plemników, poddawanych stopniowo wzrastającej dekondukcji. Zaobserwowano, że ramiona p oraz q chromosomów plemnika są zbudowane z włókien chromatyny o szerokości około 1000 nm każde. Włókno 1000 nm jest złożone z dwóch połączonych globularnych struktur (2 x 500 nm), tworzących rowek wzdłuż osi podłużnej włókna. Przyjmując wymiary toroidu jako 25 x 60–100 nm, w modelu zakłada się, że każda z globularnych struktur miałyby być utworzona przez 100–200 toroidów, co odpowiadałoby 3–5 Mbp DNA. Trzeba zauważyć, że model zaproponowany przez Mudrak i wsp. opisuje struktury większe aniżeli 300 nm, zatem nadal brak jest ogniwa, które łączyłoby go bezpośrednio z modelem „donut-loop” [10].

1.3. Model wewnątrzjądrowej topologii chromosomów plemnika

1.3.1. Lokalizacja centromerów i telomerów

Stwierdzono, iż heterochromatyna centromerów chromosomów plemnika tworzy skondensowane zgrupowanie (lub 2–3 mniejsze zgrupowania) w wyodrębnionym, centralnym regionie jądra plemnika, zwanym chromocentrum [65, 92]. Chromocentrum wyodrębnia się podczas spermiogenezy i jest strukturą unikatową dla haploidalnych spermatyd. Czynniki odpowiedzialne za formowanie chromocentrum nie są jeszcze znane. Wiadomo jednak, że z hetero-

chromatyną chromocentrum zarówno w spermatydach, jak i w dojrzałym plemniku, zasocjowane jest białko HP1 β (heterochromatin protein 1 β) [93]. Jednym z czynników, któremu przypisuje się istotną rolę w organizacji chromocentrum, w okrągłych spermatydach, jest czynnik TLF (TBP-like factor), białko, które wchodzi w interakcje z czynnikami transkrypcyjnymi wiążącymi się do sekwencji TATA [66]. W związku z tym, że chromocentrum ma wyraźnie określoną pozycję wewnątrzjądrową, nasuwa się przypuszczenie, że poprzez heterochromatynę centromerów może mieć ono bezpośredni kontakt z macierzą jądrową. Jednak bezpośrednio takich asocjacji dotąd nie przedstawiono [10].

W przeciwieństwie do centromerów, telomery chromosomów umiejscawiają się w pobliżu wewnętrznej błony jądra komórkowego plemnika, tworząc dimery i tetrametry zakotwiczone w wewnętrznej części błony jądrowej [86]. Wykazano, że dimery powstają w wyniku interakcji telomerów ramion krótkich (p) i długich (q) tego samego chromosomu, co oznacza, że chromosomy tworzą pętle, przybierając konformację „wsuwki do włosów” (hairpin). [71, 94, 95]. Zdolność telomerów do asocjacji wynika z obecności swoistych struktur chromatyny zlokalizowanych na końcach ramion p oraz q. Przypuszczalnie w genomie ojcowskim właśnie telomery jako pierwsze mają bezpośredni kontakt z cytoplazmą komórki jajowej, a opisana wyżej konformacja jest niezbędna do prawidłowej dekondensacji chromatyny w przedjądrzu męskim, co jest warunkiem prawidłowego rozwoju zygoty [76, 86]. Trzeba w tym miejscu podkreślić, iż już z wcześniejszych badań wynikało, że chronologia aktywacji genów w zygocie zależy może bardziej od zmian struktury chromatyny niż od aktywacji czynników transkrypcyjnych [96].

Przedstawiona wyżej topologia chromosomów w jądrze ludzkiego plemnika dotyczy prawdopodobnie wszystkich chromosomów, trzeba jednak zaznaczyć, iż w przypadku chromosomów akrocentrycznych i krótkich, danych doświadczalnych jest niewiele.

Ilustrację hipotez dotyczących zarówno chromocentrum i peryferyjnej lokalizacji telomerów chromosomów plemnika, budowy włókien chromatyny, jak i modelu „donut-loop” stanowi rycina 1 [8, 10, 76, 90, 92, 97].

1.3.2. Terytoria chromosomów

Analiza sygnałów uzyskiwanych metodą FISH po zastosowaniu sond malujących ramiona chromosomów i sond centromerowych pozwoliła przyjąć założenie, że każdy chromosom zajmuje określony, indywidualny obszar, tzw. terytorium chromosomowe (chromosome territory – CT) [76, 92, 95]. Z większości badań wynika, że terytoria chromosomowe mają wydłużony kształt i leżą równolegle do dłuższej osi plemnika [10]. Jedynie terytorium chromosomu 13 wykazywało zarówno wydłużony, jak i okrągły kształt. Terytoria poszczególnych chromosomów plemnika, podobnie jak i ich chromatyna są kilkakrotnie (4–6-krotnie) silniej skondensowane w po-

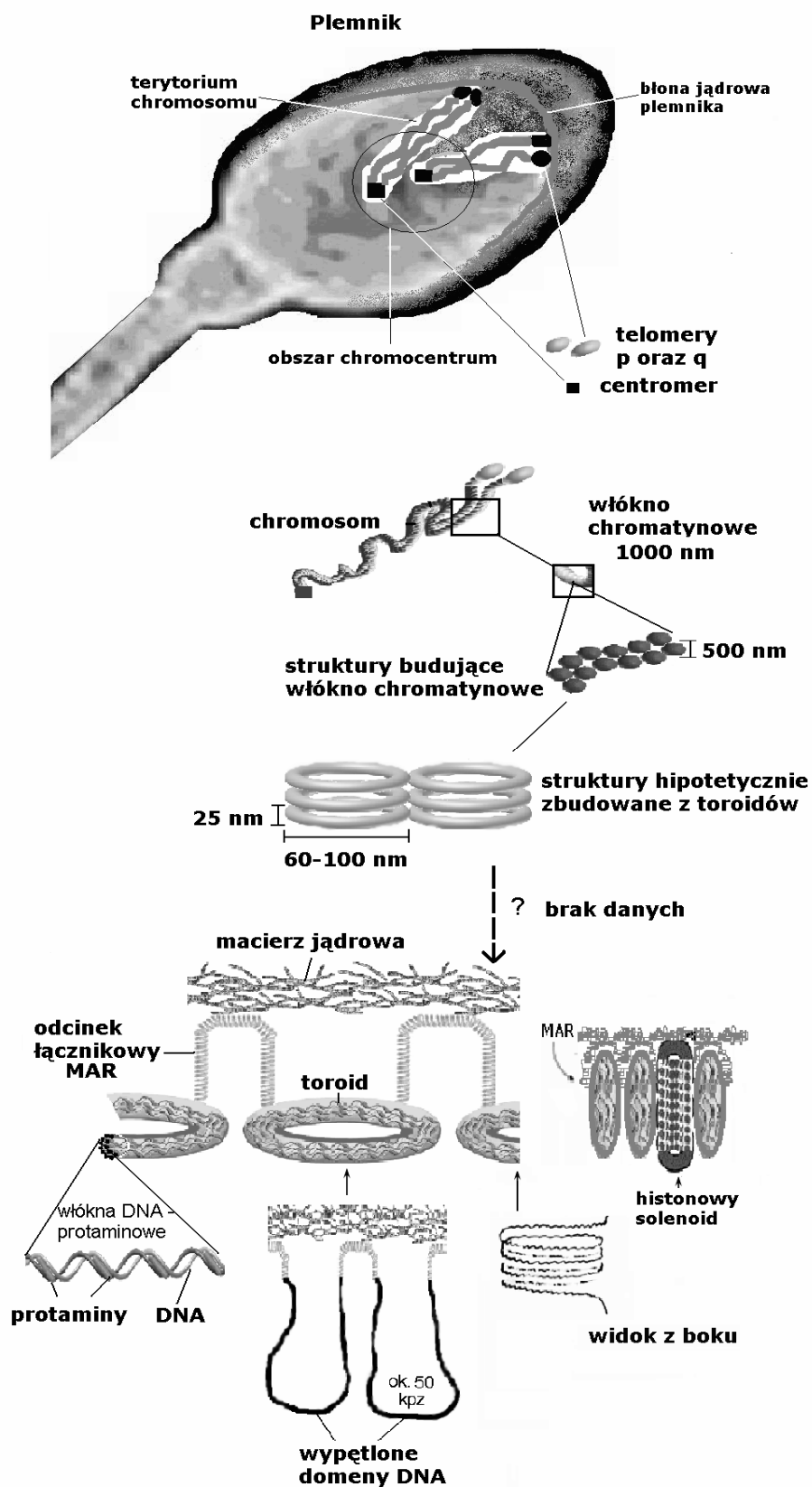
równaniu z chromosomami w komórkach somatycznych w stadium metafazy [10, 85, 95].

W 2008 roku przedstawiono wyniki analizy przestrzennej (3D) pozycji terytoriów wszystkich chromosomów ludzkiego plemnika u płodnego mężczyzny [98]. Natomiast preferencyjną, liniową (tzn. wzdłuż osi podłużnej jądra plemnika) lokalizację terytoriów analizowanych indywidualnie przedstawiono wcześniej dla 14 ludzkich chromosomów [76]. Stwierdzono, między innymi, lokalizację terytoriów chromosomów 2, 5, 18 i Y w tzw. bazalnej części jądra plemnika (tzn. sąsiadującej z witką) a chromosomów 7 i X w tzw. części apikalnej (tzn. sąsiadującej z akrosomem) [12, 76, 99]. Są dowody, że terytoria chromosomów zajmują także określoną pozycję radialną: np. chromosomy 6 i 7 bardziej peryferyjną (tzn. bliżej błony jądrowej), a 16, 18 oraz X bardziej wewnętrzną (tzn. w głębi jądra komórkowego) [12]. Z kolei dla terytorium chromosomu 13 obserwowano raczej przypadkową lokalizację [100]. Natomiast w doświadczeniach poświęconych analizie lokalizacji wszystkich pięciu chromosomów akrocentrycznych jednocześnie (tj. 13, 14, 15, 21 i 22) wykazano, że centromery tych chromosomów skupiają się w określonym obszarze zajmującym 8,3% objętości jądra plemnika. Co jednak znamienne, z doświadczeń tych wynikało, iż taką „modelową” lokalizację chromosomów akrocentrycznych stwierdzano tylko w 20% plemników [101].

Subakrosomową lokalizację chromosomu X wykazano również w jądrach komórkowych plemników u torbaczy i stekowców [102, 103, 104, 105]. W związku z tym, że jest to jednocześnie umiejscowienie bliskie miejsca pierwszego kontaktu plemnika z cytoplazmą komórki jajowej, po raz pierwszy zwrócono uwagę, że umiejscowienie chromosomów może mieć znaczenie funkcjonalne [99, 106]. Wewnątrzjądrowa pozycja chromosomu w plemniku mogłaby określać kiedy, i które domeny poszczególnych chromosomów ulegają dekondensacji i przebudowie poprzedzającej ekspresję genomu ojcowskiego. Co ciekawe, w badaniach na plemnikach świń zaobserwowano, że wewnątrzjądrowe umiejscowienie m.in. chromosomów X i Y (analizowano również chromosomy 5 i 13) ulega w trakcie spermatogenezy repozycji i w konsekwencji w plemniku jest odmienne od tej w spermatocytach [107].

Hipoteza mówiąca, że przestrzenna organizacja haploidalnego męskiego genomu zawiera informacje krytyczne zarówno dla funkcji plemnika, jak i dla wczesnego rozwoju zarodka ma obecnie coraz więcej zwolenników, choć badania dotyczące tego zagadnienia są stosunkowo nieliczne [70, 76].

Badania dotyczące architektury wewnątrzjądrowej plemników u innych gatunków są także nieliczne, wskazują jednak, że podstawowe zasady organizacji są podobne u wszystkich ssaków [10, 16, 103, 104, 108]. Natomiast w plemnikach ptaków nie stwierdzono ściśle określonej lokalizacji chromosomów lub dotyczyła ona tylko niektórych chromosomów. Pojawiły się nawet spekulacje, iż ta różnica w stosunku do ludzkich plemników mogłaby być cechą dywergencji ptaków i ssaków [104, 109].



Ryc. 1. Ilustracja hipotez dotyczących architektury wewnątrzjądrowej w jądrze ludzkiego plemnika. Szczegóły w tekście (Rozdziały 1.2. oraz 1.3.).

Fig. 1. Illustration of hypotheses about the architecture in the nucleus of the human sperm cell. Details in sections 1.2 and 1.3.

2. Aberracje chromosomów w limfocytach krwi obwodowej u nieplodnych mężczyzn

Ocena częstości występowania aberracji somatycznych dotyczących liczby i struktury chromosomów wśród nieplodnych mężczyzn zależy w znacznym stopniu od zastosowanych kryteriów doboru mężczyzn do badanej grupy oraz przyjętej definicji „nieplodności”. Dane literaturowe, wskazujące na związek pomiędzy męską nieplodnością a podwyższoną częstością występowania aberracji chromosomowych gromadzone są od wielu lat i pochodzą z licznych ośrodków, w których badano grupy znacznie różniące się liczebnością, stosowano także różne kryteria selekcji, różne definicje nieplodności idiopatycznej i oligozoospermii, jak również odmienne procedury badawcze [110]. Tym właśnie należy tłumaczyć różnice w bezwzględnych wartościach podawane przez różnych autorów [111]. Jednak pomimo powyższych zastrzeżeń, wniosek, jaki wynika z tych danych nie budzi wątpliwości: mężczyźni z niepowodzeniami rozrodu mają w istotnym stopniu podwyższone ryzyko nosicielstwa aberracji chromosomowych [110, 112, 113, 114]. Wykrycie aberracji ma kluczowe znaczenie dla oceny nieplodności i dalszego postępowania. Konsekwencją aberracji chromosomów somatycznych są anomalie w chromosomach plemnikowych.

U mężczyzn z niepowodzeniami rozrodu zarówno z nieplodnością idiopatyczną (normozoospermią), jak i z zaburzeniami spermatogenezy (oligo-, terato-, asthenozoospermią) opisano wszystkie typy aberracji dotyczące wszystkich chromosomów. Najczęściej stwierdzanymi aberracjami są te, które dotyczą chromosomów X i Y oraz translokacje zrównoważone (tabela 1.).

2.1. Mężczyźni z nieplodnością idiopatyczną (normozoospermią)

Dane literaturowe dotyczące aberracji chromosomów somatycznych u nieplodnych mężczyzn z normozoospermią są stosunkowo nieliczne i dotyczą grup o małej liczebności. Stąd dane te są niejednorodne. Szacuje się, że wśród nieplodnych mężczyzn z normozoospermią częstość wykrywanych aberracji chromosomowych wynosi około 3%, to jest kilka razy częściej niż w ogólnej populacji nowonarodzonych dzieci, w której częstość wykrywanych aberracji wynosi około 0,7% (częstość aberracji powstałych *de novo* wynosi około 0,45%). Aberracje dotyczące chromosomów autosomowych wykrywa się z częstością 1,6% (częstość translokacji wzajemnych wynosi 0,93%; translokacji robertsonowskich 0,46%; inwersji 0,23%). Częstość aberracji chromosomów X i Y szacuje się na około 1,4%, najczęściej są to przypadki mozaicyzmu komórkowego liczby chromosomów (0,93%) [115, 116].

2.2. Mężczyźni z zaburzeniami spermatogenezy

U około 13,2% mężczyzn z azoospermią oraz u około 4,3% mężczyzn z oligozoospermią wykrywa się aberracje chromosomowe (odpowiednio: około 20 i 7 razy

częściej niż w ogólnej populacji nowonarodzonych dzieci) (tabela 1.) [110]. Nie wykazano natomiast znaczących korelacji pomiędzy nosicielstwem aberracji chromosomowych a nieprawidłowościami w morfologii lub ruchliwości plemników [114, 117].

U fenotypowo normalnych mężczyzn z azoospermią (nie obstrukcyjną) częstość występowania kariotypu 47,XXY szacuje się na około 10% (to jest 70–100 razy częściej niż w ogólnej populacji nowonarodzonych dzieci), 47,XYY występuje z częstością około 0,1% (tak jak w ogólnej populacji nowonarodzonych dzieci) natomiast 46,XX występuje z częstością około 0,9% (90 razy częściej niż w ogólnej populacji nowonarodzonych dzieci). Translokacje wzajemne chromosomów autosomowych występują z częstością 0,5% (2 razy częściej niż w ogólnej populacji nowonarodzonych dzieci). Translokacje robertsonowskie występują z częstością 0,2% (2 razy częściej niż w populacji nowonarodzonych dzieci) [110].

U fenotypowo normalnych mężczyzn z azoospermią (nie obstrukcyjną) większość ze stwierdzonych aberracji dotyczyła chromosomów X lub Y (około 70% wykrywanych aberracji) (uwzględniając w grupie z azoospermią również pacjentów z zespołem Klinefeltera 47,XXY, ponad 93% aberracji dotyczy chromosomów X i Y) (więcej danych patrz Roz. 2.2.1.). Około 4% wykrywanych aberracji stanowią translokacje wzajemne, a około 2% translokacje Robertsonowskie, najczęściej są to translokacje (13;14) i (14;21).

U mężczyzn z oligozoospermią kariotyp 47,XXY występuje z częstością około 0,5% natomiast kariotyp 47,XYY występuje z częstością około 0,3% (3–5 razy częściej niż w ogólnej populacji nowonarodzonych dzieci). Translokacje wzajemne chromosomów autosomowych występują z częstością około 0,7% (2,8 razy częściej niż w ogólnej populacji nowonarodzonych dzieci). Zwraca uwagę stosunkowo wysoka częstość translokacji robertsonowskich: około 1,5% (15 razy częściej niż w ogólnej populacji nowonarodzonych dzieci) [110].

U fenotypowo normalnych mężczyzn z oligozoospermią (o różnym nasileniu, a także w oligoasthenolub/i oligoteratozoospermii) większość, bo około 67% z wykrywanych aberracji dotyczyła chromosomów autosomowych. Najczęstszym typem tych aberracji są translokacje robertsonowskie (35%). W większości przypadków są to translokacje (13;14) (około 70%), translokacje (14;21) (16%) oraz translokacje (13;15) (6%). Translokacje wzajemne stanowią 16% z wykrywanych aberracji. Inwersje wykrywa się z częstością około 8%. Około 7% z wykrywanych aberracji stanowią chromosomy markerowe (więcej danych patrz Roz. 6.3). Natomiast częstość aberracji dotyczących chromosomów X lub Y jest dużo niższa w porównaniu z mężczyznami z azoospermią i wynosi około 33% (w tym 12% to 47,XXY a 8% to 47,XYY) [110]. Wśród fenotypowo normalnych osób będących nosicielami złożonych przegrupowań, w które zaangażowanych jest więcej niż dwa chromosomy, mężczyźni stanowią 22%. W tej grupie 18% ma niepowodzenia rozrodu (w połowie z powodu braku koncepcji

oraz w połowie z powodu niezrównoważenia genetycznego u potomstwa) [118].

Wiadomo również, że nosicielstwo chromosomów pierścieniowych różnego pochodzenia, nawet w przypadkach fenotypowo normalnych mężczyzn, związane jest z męską niepłodnością [119, 120, 121, 122, 123, 124]. Najczęściej niepłodność związana jest z zatrzymaniem spermatogenezy podczas pierwszego podziału mejotycznego [119].

2.2.1. Nosiciele aberracji liczby i struktury chromosomów X lub Y

Wśród ogółu niepłodnych mężczyzn częstość aberracji dotyczących liczby i struktury chromosomów X lub Y wynosi ponad 4%, to jest około 40 razy częściej niż u żywo narodzonych dzieci (dane statystyczne nie są jednorodne).

Pierwsze, dziś już „historyczne”, badania wiążące niepłodność z aberracjami chromosomowymi dotyczyły właśnie chromosomów X i Y: w 1956 roku u niepłodnego mężczyzny opisano kariotyp 47,XXY (zespół Klinefeltera). Wśród ogółu niepłodnych mężczyzn zespół ten występuje ze średnią częstością około 3%, wśród mężczyzn z azospermia z częstością około 10%, natomiast z oligozoospermia z częstością około 0,5%. Wśród tych mężczyzn z azospermia, u których wykryto aberracje chromosomowe, kariotyp 47,XXY stanowi około 67% tych aberracji, a u mężczyzn z oligozoospermia – 12% [110].

Większość spośród fenotypowo normalnych nosicieli aberracji liczby chromosomów X lub Y jest niepłodnych,

istotnym wyjątkiem są mężczyźni o kariotypie 47,XYY oraz przypadki mozaicyzmu komórkowego liczby chromosomów.

Kariotyp o wzorze 47,XYY występuje z częstością 0,1% wśród żywo urodzonych chłopców. Wśród nosicieli XYY są zarówno mężczyźni płodni, jak i niepłodni. W grupie niepłodnych mężczyzn z oligozoospermia kariotyp 47,XYY występuje z częstością około 0,3% i stanowi około 8% spośród wykrywanych aberracji. U nosicieli XYY z zaburzoną lub całkowitym brakiem spermatogenezy obserwowano szerokie spektrum zmian morfologicznych w kanalikach plemnikotwórczych obejmujących szklwienie kanalików, zahamowanie spermatogenezy na pewnym etapie różnicowania lub tzw. zespół samych komórek Sertolego [110]. U mężczyzn z oligoasthenoteratoospermia opisano wyjątkowy kariotyp mozaikowy 46,XY/51,XYYYYYY [125].

Wśród niepłodnych mężczyzn (z azospermia lub oligoasthenoteratoospermia) opisano około dwudziestu przypadków translokacji X-chromosom autosomowy. Translokacje te dotyczyły różnych autosomów: 1, 2, 3, 4, 5, 7, 12, 14, 18, 21 oraz 22, różne były także punkty pęknięć na chromosomie X [110, 126, 127]. U nosicieli translokacji X-chromosom autosomowy zahamowanie spermatogenezy następowało na etapie spermatocytów I rzędu, większość komórek była w stadium pachytenu, a w nielicznych metafazach stwierdzano obecność łańcuchowych kwadriwalentów, złożonych z chromosomu Y, pochodnego X, pochodnego chromosomu autosomowego i normalnego chromosomu autosomowego [128].

Tab. 1. Częstości występowania wybranych aberracji chromosomowych w limfocytach krwi obwodowej u niepłodnych mężczyzn (na podstawie danych z [110])

Tab. 1. Frequencies of the occurrence of selected chromosomal aberrations in the lymphocytes of peripheral blood in infertile men (on the basis of the data in [110])

Typ aberracji	Typ niepłodności										Kontrola %					
	normozoospermia %			oligozoospermia %				azospermia %								
47,XXY	0			0,5				10,0			0,1					
47,XYY	0,23			0,3				0,1			0,1					
46,XX ²	0			0				0,9			0,01					
TCW*	0,93			0,7				0,5			0,15					
TR**	0,46			1,5				0,2			0,12 [®]					
inwersje	0,23			0,3				0,1			0,12					
markery•	0,2			0,3				0,2			0,07					
mozaiki•	0,93			0,4				0,7			b.d. [‡]					
inne	0,02			0,3				0,5			b.d. [‡]					
SUMA	3,0%			4,3%				13,2%			0,7%					
Typ aberracji	autosomy 54%			X,Y 46%		autosomy 67%				X,Y 33%		autosomy 7%		X,Y 93%		
	TCW	TR	inwersje	47,XYY	mozaiki	TCW	TR	inwersje	markery	47,XXY	47,XYY	TCW	TR	47,XXY	46,XX ²	mozaiki
	%	%	%	%	%	%	%	%	%	%	%	%	%	%	%	%
	b.d. [‡]			b.d. [‡]		16	35	8	8	12	8	4	2	67	7	10

Kontrola \blacksquare = populacja nowonarodzonych dzieci; 46,XX² = 46,XX (SRY²), *TCW = translokacje chromosomowe wzajemne; **TR = translokacje robertsonowskie; [®] 1 – 2% uwzględniając warianty polimorficzne chromosomów 1, 9, 16 oraz Y; • markery = chromosomy markerowe; • mozaiki = mozaiki chromosomów X i Y; [‡] b.d. = brak danych

W populacji ogólnej częstość translokacji wzajemnych Y-chromosomy autosomowe wynosi około 1:2000 urodzeń. Opisano u mężczyzn ponad 40 takich translokacji. Dotyczyły one różnych autosomów: 1, 2, 4, 6, 10, 13, 15, 16, 21 i 22, a punkty pęknięcia na chromosomie Y występowały najczęściej na długim ramieniu Y [110, 129, 130, 131]. Niektóre z translokacji z udziałem chromosomu akrocentrycznego miały stosunkowo niewielki wpływ na płodność, ale w tych przypadkach, które dotyczyły krótkiego ramienia chromosomu akrocentrycznego, 80% nosicieli wykazywało azoospermie [131, 132]. Nosiciele innych translokacji Y-chromosomy autosomowe byli nieplodni najczęściej w tych przypadkach, kiedy punkt pęknięcia na chromosomie Y znajdował się w regionie Yq11. U mężczyzny z azoospermie opisano unikatową translokację *de novo* t(Y;1)(q12;q12), z utratą regionu heterochromatynowego w chromosomie 1 [133]. Interesującą wydaje się obserwacja, iż wśród nosicieli takiej samej (rodzinnej) translokacji Y-chromosom autosomowy występują zarówno plodni, jak i nieplodni mężczyźni [110, 128]. U mężczyzny z azoospermie opisano również rzadkie przypadki translokacji X-Y. U dwóch nosicieli obserwowano zahamowanie mejozy na etapie spermatocytów I rzędu [134], a u jednego znaczną oligozoospermie [135].

Okolo 0,9% mężczyzn z azoospermie (i prawidłowym fenotypem) ma kariotyp 46,XX (SRY⁺) (to jest 90 razy częściej niż w ogólnej populacji nowonarodzonych dzieci), który powstaje w wyniku translokacji między Xp a Yp i obejmuje gen SRY, istotny dla determinacji płci męskiej [110, 136]. Natomiast przyczyną azoospermii jest brak czynnika AZF (azoospermic factor, locus Yq11). Kariotyp 46,XX występuje wśród mężczyzn z częstością 1:20000–25000, około 10% pacjentów wykazuje obojnacze genitalia i/lub spodziewstwo a 30% objawia ginekomastie w okresie pokwitania. Alternatywnym mechanizmem występowania kariotypu 46,XX u mężczyzny może być mozaicyzm (linie komórkowe 46,XY), a w bardzo rzadkich przypadkach o genotypie 46,XX (SRY⁻) u mężczyzn o prawidłowym fenotypie i z nieplodnością lub w przypadkach występowania prawdziwego hermafrodytyzmu u osób o płci niejasnej, przyczyną mogą być mutacje genów wpływające na różnicowanie się płci, zlokalizowanych poza chromosomem Y [137, 138, 139].

U mężczyzny z azoospermie wykryto przypadek translokacji t(Yp;Yq). U tego pacjenta stwierdzono w gonadach zahamowanie gametogenezy na etapie spermatocytów I rzędu [140].

Wśród nieplodnych mężczyzn opisano przypadki nosicieli dicentrycznych chromosomów Y, u których delecje spowodowały supresję aktywności kinetochoru w jednym z regionów centromerowych, powodując tym samym stabilizację dicentrycznej struktury. Delecje te, choć umożliwiają stabilizację zmienionego strukturalnie chromosomu Y, są jednocześnie przyczyną nieplodności, bowiem zazwyczaj obejmują gen kodujący czynnik AZF [141].

2.2.1.a. Mikrodelecje w chromosomie Y

Ludzki chromosom Y wykazuje kilka biologicznych cech, które wyróżniają go spośród innych chromosomów. Chromosom Y zawiera ponad 60 milionów nukleotydów (w znacznej części są to sekwencje powtarzalne tworzące heterochromatynę) i najmniejszą liczbę funkcjonalnych genów: zidentyfikowano 78 genów kodujących białko i 27 różnych białkowych produktów. Wśród tych genów jest jednak wiele gonadowo-specyficznych, kluczowych dla spermatogenezy oraz determinacji płci. Region długiego ramienia chromosomu Y (Yq11), w którym zlokalizowane są geny istotne dla spermatogenezy, nazwano regionem AZF (azoospermic factor). Po raz pierwszy wykazano istotną rolę tego regionu dla spermatogenezy w 1976 roku, kiedy to metodą kariotypowania stwierdzono duże delecje regionu Yq u kilku mężczyzn z azoospermie [142]. Delecje (mikrodelecje) regionu AZF są najczęściej stwierdzaną przyczyną zaburzeń spermatogenezy. Ocenia się, że około 10%–15% mężczyzn z azoospermie lub ciężką oligozoospermie ma mikrodelecje w regionie AZF [143]. Badania molekularne tego regionu u dużej liczby nieplodnych mężczyzn pozwoliły zaobserwować pewne zależności pomiędzy położeniem delecji w obrębie AZF a fenotypem. Region ten został umownie podzielony na trzy podregiony: dystalny AZFc, środkowy AZFb oraz proksymalny AZFa [144]. Delecje stwierdzane u pacjentów z zespołem komórek Sertolego występowały najczęściej w AZFa. Delecje w AZFb powiązane były ze zjawiskiem asynapsis i zatrzymaniem w spermatocytach podziałów meiotycznych na etapie wczesnego pachytenu. Natomiast delecje w AZFc (60% wszystkich delecji w regionie AZF) związane były z różnymi fenotypami (od zespołu komórek Sertolego do hipospermatogenezy). Wykazano również, że duże delecje powiązane były z całkowitym brakiem plemników a w przypadkach małych delecji mogła powstawać niska liczba plemników [143, 145, 146].

Wśród nieplodnych nosicieli mikrodelecji w regionie AZF chromosomu Y znane jest zjawisko jednoczesnego występowania mozaicyzmu 45,X/46,XY w limfocytach krwi obwodowej [147, 148]. Mozaicyzm taki stwierdzano również u mężczyzn z dużymi (tzn. mikroskopowo widocznymi) aberracjami w chromosomie Y [132]. Obserwacje te mogą sugerować ogólną niestabilność chromosomu Y, szczególnie w dystalnym fragmencie Yq11, powodującą w konsekwencji tendencję do utraty chromosomu Y w podziałach komórkowych [149, 150]. Potwierdziły to badania chromosomów plemnikowych przeprowadzone u 11 mężczyzn z delecjami w regionie AZFc, które wykazały, że tylko 33% plemników miało chromosom Y (i 49% plemników kontrolnych) [151].

U niektórych mężczyzn z teratozoospermie i prawidłowym kariotypem (badanym w limfocytach) opisano mikrodelecje chromosomu Y wykrywane jedynie w plemnikach. Prawdopodobnie u mężczyzn tych występował mozaicyzm w tkance gametogenicznej [152].

3. Zaburzenia w mejozie u mężczyzn

Ocenia się, iż co najmniej 8% rozpoznanych ciąż u człowieka wykazuje aberracje dotyczące liczby (około 7%) lub struktury (około 1%) chromosomów [153]. Większość z tych aberracji nie powstaje *de novo* w zygocie, ale jest pochodzenia rodzicielskiego: jest konsekwencją błędów w mejozie podczas gametogenezy u rodzica o prawidłowym kariotypie somatycznym. U zdrowych, płodnych mężczyzn o prawidłowym kariotypie somatycznym, podział mejotyczny może przebiegać nieprawidłowo nawet w kilku procentach spermatocytów. Szacuje się, że pochodzenie ojcowskie ma jedynie 30% przypadków trisomii autosomów (5%–10% przypadków trisomii chromosomu 21, 11% przypadków trisomii chromosomu 22, do 12% trisomii chromosomów 13 oraz 15, 17% trisomii chromosomu 14). Ojcowskie pochodzenie ma natomiast większość (> 50%) trisomii chromosomów X lub Y (6% przypadków 47,XXX; do 50% 47,XXY; 100% 47,XYY) [154, 155]. Kariotyp 24,XY powstaje w wyniku nondysjunkcji w pierwszym podziale mejotycznym (MI), natomiast 24,XX lub 24,YY w drugim podziale mejotycznym (MII). Ojcowskie pochodzenie ma ponadto 60% triploidii (diandria = triploidia ojcowskiego pochodzenia) [156] oraz większość, bo około 84% aberracji strukturalnych chromosomów (85% przypadków częściowej delecji 18q; 80% przypadków zespołu Wolfa–Hirschhorna (4p-); do 90% przypadków zespołu cri-du-chat (5p-) [154, 157].

Badania prowadzone metodami immunocyto-genetycznymi nad przebiegiem mejozy w spermatocytach wykazały, iż istotną przyczyną aneuploidii są błędy w koniugacji chromosomów w profazie mejozy, redukcja liczby rekombinacji i w konsekwencji brak chiazm [113, 158, 159]. Obecność chiazm wydaje się być niezbędnym warunkiem prawidłowej segregacji homologicznych chromosomów. Biwalenty homologicznych chromosomów bez chiazm są niezdolne do prawidłowej orientacji w metafazie lub do segregacji chromosomów do komórek potomnych [160]. Takie biwalenty w prawidłowej spermatogenezie zdarzają się z częstością około 0,3% [161]. Choć wszystkie chromosomy mogą ulegać aneuploidii, jej częstość jest najwyższa w przypadku tych chromosomów, które mają tylko jedno miejsce rekombinacji, a więc najmniejszych (szczególnie 21, 22) oraz X i Y (rekombinacja w biwalentach płci ograniczone jest do regionu pseudoautosomalnego) [162, 163, 164, 165, 166]. Ze względu na wysoką częstość zespołu Downa, trisomia chromosomu 21 jest jedną z najczęstszych badanych aneuploidii u ludzi (zespół Downa: 1/600–1/1000), 95% przypadków ma dodatkowy chromosom 21, około 1% ma mozaicyzm, pozostałe przypadki związane są z obecnością izochromosomu 21 lub translokacją z udziałem chromosomu 21) [167]. Około 6%–10% wszystkich przypadków trisomii chromosomu 21 spowodowanych jest błędami w spermatogenezie, przy czym stosunek błędów w pierwszym i drugim podziale mejotycznym (MI:MII) wynosi prawie 1:1 [167, 168]. W

tych przypadkach trisomii chromosomu 21, w których nondysjunkcja miała miejsce w MI, wykazano zredukowany poziom rekombinacji między chromosomami 21, natomiast w przypadkach MII zjawisko to nie występowało [169]. Choć pojawiały się sugestie o związku między starszym wiekiem mężczyzną a wzrostem poziomu nondysjunkcji chromosomu 21 w mejozie (podobnie jak i innych chromosomów), nie udało się tego wykazać u nielicznych badanych [154].

W 2004 roku opublikowano „mapę” przedstawiającą miejsca i pozycje miejsc rekombinacji na każdym z ludzkich chromosomów [164]. U mężczyzn o prawidłowej spermatogenezie średnia liczba miejsc rekombinacji w komórce w stadium pachytenu wynosiła około 50/komórkę, trzeba jednak podkreślić, iż występowała znaczna zmienność w częstości rekombinacji, zarówno międzykomórkowa, jak i międzyosobnicza (bez związku z wiekiem mężczyzny) [161, 170]. Wyniki te były zbliżone do liczby chiazm obserwowanych w diakinezie [171]. Wykonana u 11 mężczyzn o prawidłowej spermatogenezie analiza liczby miejsc rekombinacji w pojedynczej komórce wykazała wartości od 21 do 65 (średnia 48,0/komórkę), natomiast średnie częstości rekombinacji u poszczególnych mężczyzn wynosiły od 42,5 do 55,0/komórkę [161]. Zjawisko zmiennej liczby miejsc rekombinacji mejotycznej znane jest od dawna, ale jego przyczyny nie są poznane [161, 172, 173].

Znajomość „mapy” rekombinacji dla poszczególnych chromosomów umożliwiła porównanie przebiegu koniugacji chromosomów i częstości rekombinacji w tkance gametogenicznej gonady u kilkudziesięciu mężczyzn zarówno w grupie kontrolnej z prawidłową spermatogenezą, jak i u mężczyzn z azoospermia o różnym podłożu, u których występowały komórki mejotyczne [166, 170, 174, 175]. Stwierdzono wówczas, że średnia częstość miejsc rekombinacji w grupie kontrolnej wynosiła 45,9/komórkę, u mężczyzn z azoospermia obstrukcyjną (tzn. z zablokowanymi drogami wyprowadzającymi) 44,8/komórkę, a u mężczyzn z azoospermia nieobstrukcyjną 40,0/komórkę. Stwierdzenie obniżonej częstości rekombinacji w przypadku mejozy u mężczyzn z azoospermia obstrukcyjną było raczej nieoczekiwanym spostrzeżeniem; autorzy nie wykluczyli, że mężczyźni ci mogli mieć więcej niż jedną przyczynę azoospermii [174]. U badanych mężczyzn z azoospermia nieobstrukcyjną zaburzenia w spermatogenezie były bardzo różnorodne: u 5% mężczyzn podziały ulegały zatrzymaniu już na etapie zygotenu profazy MI, u 50% mężczyzn stwierdzono komórki w stadium pachytenu, natomiast u 45% mężczyzn wykazano całkowity brak komórek mejotycznych. Wśród tych mężczyzn z azoospermia nieobstrukcyjną, u których występowały komórki w stadium pachytenu, 70% miało zaburzenia w kompleksie synapsonemalnym, a 80% miało znaczące obniżenie częstości rekombinacji. Średnio 29% komórek w pachytenie tworzyło biwalenty bez miejsc rekombinacji (5% w komórkach płodnych mężczyzn) [170]. Analizowano również kompleksy synaptonemalne u nosiciela aberracji *inv* 2(p11;q13) z azoo-

spermią, u którego w ogóle nie zidentyfikowano spermatocytów w stadium pachytemu i biwalentów XY. Był to interesujący przypadek, bowiem komórki mejotyczne „naśladowały” mitozę: całkowity brak rekombinacji powodował, że komórki miały diploidalną liczbę niesparowanych chromosomów. Komórki te nie miały również systemu mikrotubul, degenerowały i obumierały [176].

Niewątpliwie, analiza kompleksów synaptonemalnych i rekombinacji metodą immunofluorescencyjną pozwoliła uwidocznić, iż błędy w parowaniu chromosomów oraz nieprawidłowa rekombinacja są istotnymi czynnikami powodującymi nondysjunkcję chromosomów, a przede wszystkim są przyczyną zaburzonej spermatogenezy. Konsekwencją tych zaburzeń może być zarówno utrata komórek mejotycznych, prowadząca do azoo- lub oligozoospermii, jak również błędy w segregacji chromosomów powodujące aneuploidie [177]. Natomiast genetyczne podłoże błędów w mejozie u badanych mężczyzn pozostało nieznanne [170, 176].

4. Chromosomy plemników u płodnych mężczyzn

Chromosomy plemników są końcowym produktem mejozy. Analiza chromosomów w plemnikach dostarcza informacji o tych strukturalnych i liczbowych aberracjach, które uniknęły wyeliminowania w trakcie mejozy. Chromosomy dojrzałych plemników mogą być badane poprzez dwa różne podejścia metodyczne: 1) poprzez badanie chromosomów metafazowych uzyskanych z przedjądrzy męskich po ksenogenicznej penetracji plemników do oocytów chomika (metodę określa się jako „kariotypowanie chromosomów plemnika”), 2) poprzez analizę sygnałów FISH uzyskanych na zdekonduowanych jądrach komórkowych. Pierwsza metoda umożliwia bezpośrednią obserwację chromosomów plemnika [178]. Jest to istotna zaleta tej metody. Chromosomy metafazowe plemnika można analizować zarówno po barwieniu Giemzą, jak i po reakcji FISH. Metoda ta jest trudna technicznie i czasochłonna, preparaty chromosomów metafazowych plemnika zasadniczo odbiegają jakością od chromosomów komórek somatycznych. Możliwe do analizy chromosomy plemników uzyskuje się jedynie w połowie spośród spenetrowanych oocytów. Zatem liczba preparatów zależy od liczby uzyskanych i spenetrowanych oocytów, a więc jest stosunkowo niewielka (maksimum 150 w jednym doświadczeniu wykonywanym przez jedną osobę, średnio około 56). Zasadniczą jednak jej wadą jest fakt, iż uzyskuje się informację wyłącznie o chromosomach tych plemników, które spenetrowały komórkę jajową. W przypadku niepłodnych mężczyzn, u których plemniki mają bardzo niską zdolność penetracji oocytów, metoda ta nie może być użyta. Można wówczas zastosować pewną odmianę tej metody, która polega na podaniu ludzkich plemników do oocytów mysich [179]. Kariotypowano chromosomy metafazowe plemników pochodzących zarówno od płodnych, jak i niepłodnych mężczyzn, od nosicieli aberracji chromo-

somów somatycznych oraz od mężczyzn po radioterapii lub chemoterapii [180]. Trzeba podkreślić, iż dane literaturowe dotyczące chromosomów plemnikowych metafazowych uzyskanych po ksenogenicznej penetracji plemników do oocytów pochodzą tylko z kilku wiodących ośrodków naukowych [181, 182, 183, 184, 185, 186].

Badanie chromosomów plemnikowych metodą FISH na zdekonduowanych jądrach plemników nie wymaga penetracji plemników do oocytów i może być zastosowane na dowolnie dużej liczbie plemników (dane literaturowe pochodzą z licznych ośrodków, przedstawiają wyniki dotyczące od 1000 do 5000 a pojedyncze publikacje nawet do 10000 plemników dla jednej sondy u jednego mężczyzny). FISH z użyciem sond centromerowych stosowano analizując plemniki u płodnych mężczyzn, u niepłodnych mężczyzn, u nosicieli aberracji chromosomów somatycznych oraz u mężczyzn po chemoterapii. Stosując kombinację sond centromerowych i telomerowych badano wzory segregacji mejotycznej u nosicieli aberracji chromosomów somatycznych [180]. Trzeba jednak pamiętać, iż w tej metodzie „widoczne” są tylko te chromosomy (a właściwie ich fragmenty), dla których zastosowano odpowiednie sondy. Poza tym, ze względu na specyficzną strukturę chromatyny plemnika, penetracja sond do jąder plemników jest możliwa dopiero po dekonduacji i rozszczelnieniu tychże jąder. Można zminimalizować to ograniczenie stosując metodę PRINS (PRimed IN Situ) z użyciem fluorochromów [187, 188, 189]. Metoda PRINS polega na wykonaniu reakcji PCR bezpośrednio na utrwalonych preparatach cytologicznych z użyciem starterów będących fragmentami alfa-satelitarnych sekwencji DNA specyficznych dla danego chromosomu. W reakcji PRINS-FISH dekonduacja jest mniej ograniczającym czynnikiem, bowiem stosuje się krótkie startery (18–35 nukleotydów) połączone z fluorochromami, które łatwiej penetrują do jądra plemnika. Żadna z powyższych metod nie jest wiarygodna w ocenie częstości nullisomii w plemnikach; bowiem „nie odróżnia” artefaktu powstałego w wyniku procedury od faktycznej nullisomii. Najczęściej zakłada się, że częstość nullisomii dla badanego chromosomu jest równa częstości disomii (tzw. ocena zachowawcza). Zarówno pierwszą, jak i drugą metodą zbadano częstość aneuploidii każdego z 23 chromosomów plemnika [153]. Porównanie wyników uzyskiwanych dwoma metodami prowadzi do wniosku, że badanie chromosomów metafazowych jest bardziej informatywna w przypadku analizy aberracji strukturalnych, znacznie mniej informatywna do oceny częstości disomii (uzyskiwane częstości są 3 razy niższe), natomiast nie nadaje się do badania częstości diploidii, bowiem po penetracji plemników do oocytów chomika diploidia może być wynikiem polispermii [190]. W oparciu o wyniki uzyskane metodą dwu- lub trójkolorowego FISH (z około 30 publikacji z różnych ośrodków), szacuje się, że u młodych (średnia wieku 34 lata), zdrowych, płodnych mężczyzn o prawidłowym kariotypie somatycznym, częstość aneuploidii w plemnikach większości z autosomów mieści się w zakre-

się od 0,03 do 0,12%, natomiast dla chromosomów 3, 14, 21 i 22 jest wyższa (w zakresie od 0,2 do 0,47%). Średnia częstość disomii autosomów wynosi 0,1%. Dla chromosomów X i Y średnia częstość disomii jest znacząco wyższa i wynosi 0,26% [153, 191]. Z sumowania tych średnich wartości wynika, że co najmniej 2,2% plemników ma disomię któregoś z chromosomów (oraz 2,2% nullisomię). Średnią częstość plemników diploidalnych szacuje się na 0,19% [153]. Zatem wniosek z badań prowadzonych metodą FISH jest taki, iż minimum 4,5% wszystkich plemników ma jakąś aberrację dotyczącą liczby chromosomów. Przy zastosowaniu tylko analizy chromosomów metafazowych plemnika wartość ta jest niższa i wynosi około 1,8% [153]. W wynikach dotyczących częstości disomii i diploidii w plemnikach, uzyskiwanych metodą FISH przez różnych autorów, występują znaczne różnice, np. rozpiętość wyników dotyczących częstości disomii chromosomu 18 wynosi od 0,03 do 0,25%, natomiast X oraz Y od 0,1 do 0,43%. W przypadku diploidii, do stwierdzenia której konieczne jest zastosowanie conajmniej trzech różnych sond (podobnie jak do badania aneuploidii chromosomów X i Y), różnice są jeszcze większe: od 0,01 do 0,35%. Można jedynie domniemywać, iż różnice te wynikają ze stosowania różnego rodzaju sond oraz subiektywnych kryteriów stosowanych przez osoby oceniające preparaty, kiedy uznać, że dwa sygnały FISH tego samego koloru znajdujące się bardzo blisko siebie oznaczają disomię (kryterium powinna stanowić odległość większa niż średnica sygnału). Wspomniane różnice powodują, iż każda grupa badająca anomalie dotyczące chromosomów plemnikowych analizuje uzyskiwane wyniki w oparciu o własne grupy kontrolne.

Na podstawie danych uzyskiwanych poprzez badanie chromosomów metafazowych plemnika ocenia się, że średnia częstość aberracji struktury chromosomów plemnikowych wynosi 6,6%. Najczęstszą anomalią są pęknięcia chromosomów. Stosunkowo najczęściej pęknięć obserwowanych jest w chromosomie 9, szczególnie między centromerem a regionem 9q+, co może korespondować z wysoką częstością (około 1%) występowania w populacji ogólnej inwersji pericentrycznej $inv(9)(p11q13)$ [153].

Sumując wyniki dotyczące poziomu aberracji liczby oraz struktury chromosomów w plemnikach uzyskuje się średnią częstość wszystkich aberracji około 10%. Trzeba jednak podkreślić, że odsetek plemników, w których wykrywa się aberrację różni się znacznie u poszczególnych mężczyzn, zawierając się w przedziale od kilku do kilkunastu procent. Przyczyny tych indywidualnych różnic są niejasne. Szacuje się, że około 20% płodnych mężczyzn o prawidłowym kariotypie somatycznym może mieć podwyższoną częstość aberracji chromosomów w plemnikach, w porównaniu do średnich wartości [192, 193]. W grupie tej występuje podwyższone ryzyko posiadania potomstwa z aberracją ojcowskiego pochodzenia. Wykazano, iż w plemnikach niektórych ojców dzieci z zespołem Downa, zespołem Turnera lub zespołem Klinefeltera występuje podwyższona częstość disomii badanych chromosomów [194, 195, 196, 197].

Niektórzy autorzy wykazują niewielkie korelacje pomiędzy wiekiem mężczyzny a podwyższoną częstością disomii, diploidii oraz aberracji strukturalnych chromosomów w plemnikach [153, 154, 193].

Badano także wpływ nikotyny, kofeiny i alkoholu na poziom aberracji chromosomów w plemnikach [198]. Sugeruje się, że czynniki te mogą wpływać na wzrost częstości aneuploidii, szczególnie chromosomów X i Y. Wydaje się również, iż u części palaczy papierosów występuje osobniczo podwyższona podatność na indukcję aneuploidii w plemnikach przez nikotyne [198].

U zdrowych, płodnych mężczyzn o prawidłowym kariotypie, stosunek plemników z chromosomem X do plemników z chromosomem Y wynosi 1:1.

5. Chromosomy plemników u nieplodnych mężczyzn o prawidłowym kariotypie somatycznym

Z około 40 opublikowanych dotychczas badań wynika, że u nieplodnych mężczyzn o prawidłowym fenotypie i kariotypie w limfocytach krwi obwodowej, średni poziom disomii i diploidii chromosomów w plemnikach jest istotnie wyższy (2–10 x) w porównaniu z wynikami uzyskiwanymi dla płodnych mężczyzn [111, 158, 199]. Większość autorów wskazuje na około trzykrotny wzrost poziomu aneuploidii [200, 201]. Podwyższony poziom aneuploidii dotyczy większości mężczyzn z różnymi typami niepłodności (tzn. oligo-, astheno-teratozoospermia) oraz części mężczyzn z niepłodnością idiopatyczną (normozoospermia). Wśród nieplodnych mężczyzn występują wyjątkowo duże różnice osobnicze dotyczące częstości aneuploidii autosomów i chromosomów płci w plemnikach [199]. Różnice te stwierdzano w każdym z badanych typów niepłodności, ale dotychczas nie udało się ich skorelować z określonymi typami niepowodzeń rozrodu, choć takie próby wielokrotnie podejmowano [111, 199, 202, 203, 204]. Trzeba jednak pamiętać, że dane literaturowe pochodzą z różnych ośrodków, w których stosowano niejednorodne kryteria doboru pacjentów i liczebności badanych grup. Nie budzi wątpliwości tylko fakt, że we wszystkich badanych grupach mężczyzn z niepowodzeniami rozrodu częstość aberracji chromosomów w plemnikach była wyższa w porównaniu do grup kontrolnych. Jedynie w przypadku pewnego rodzaju teratozoospermii (kilkuwitkowe plemniki o dużych główkach) można mówić o korelacji morfologii z kariotypem plemnika: wszystkie plemniki z tą wadą wykazywały aberracje liczby chromosomów [117].

Nie ma jak dotąd danych, które by wskazywały, że aneuploidia chromosomów plemnikowych obniża zdolność plemników do penetracji oocytów. Uważa się jednak, że wzrost częstości aneuploidii w plemnikach jest jednym z wykładników zaburzonego procesu spermatogenezy, stąd zjawisku temu przypisuje się dużą rolę w etiologii niepowodzeń rozrodu [71, 201, 205].

5.1. Chromosomy plemników u mężczyzn z zaburzeniami spermatogenezy

Najwięcej danych literaturowych dotyczy aneuploidii chromosomów plemników analizowanych metodą FISH u mężczyzn z oligozoospermia. Łącznie u ponad dwustu nieplodnych mężczyzn analizowano związek pomiędzy obniżoną liczbą plemników w ejakulacie ($< 20 \times 10^6/\text{ml}$) a poziomem aneuploidii. Niemalże we wszystkich przypadkach stwierdzano odwrotną korelację pomiędzy gęstością plemników a podwyższonym poziomem sumy disomii chromosomów autosomowych oraz, przede wszystkim, chromosomów X i Y [199, 206, 207]. Spośród badanych chromosomów, jedynie częstość aneuploidii chromosomu 16 nie wykazywała korelacji z oligozoospermia [199]. Wykazano również, że oligozoospermii towarzyszył podwyższony poziom duplikacji, delecji i pęknięć w chromosomie 1 (przede wszystkim w regionie 1cen-1q12, który stanowi około 4% haploidalnego genomu), przy czym liczba pęknięć była negatywnie skorelowana z gęstością plemników [208, 209].

Azoospermia nieobstrukcyjna stanowi najpoważniejsze zaburzenie spermatogenezy, stąd można by oczekiwać wyjątkowo wysokiej częstości aneuploidii w plemnikach uzyskiwanych z najądrza. Dotychczas analizowano chromosomy 1, 13, 17, 18, 21, X oraz Y u kilkudziesięciu mężczyzn z azoospermia [4160, 210]. Wyniki badań pochodzących z różnych ośrodków, nie są jednorodne, być może z powodu małej liczby analizowanych plemników u poszczególnych pacjentów. Większość autorów obserwowała znamienne wyższą częstość aneuploidii w stosunku do kontroli; w niektórych badaniach był to poziom porównywalny z częstością obserwowaną w plemnikach pacjentów z silną oligozoospermia lub wyższy [48].

Dane dotyczące związku pomiędzy asthenozoospermia a podwyższonym poziomem aneuploidii chromosomów w plemnikach są niejednoznaczne. Asthenozoospermia jako izolowana wada, której nie towarzyszy oligo- i/lub teratozoospermia, występuje w mniej niż 20% przypadków nieplodności związanej z nieprawidłowymi cechami ejakulatu [211]. Analizowano metodą FISH chromosomy plemników u około pięćdziesięciu takich pacjentów (większość autorów analizowała chromosomy 18, X oraz Y) [212, 213]. Jedynie w kilku przypadkach wykazano wzrost poziomu aneuploidii chromosomów w plemnikach. Badano także chromosomy w plemnikach frakcjonowanych metodą „swim-up” lub metodą wirowania na gradiencie perkolu. Większość autorów nie wykazała istotnych różnic w poziomie aneuploidii w poszczególnych frakcjach zarówno u mężczyzn o prawidłowym ejakulacie, jak i od pacjentów z asthenozoospermia [213].

Badano również poziom aneuploidii chromosomów X oraz Y u trzech mężczyzn, u których całkowita asthenozoospermia spowodowana była strukturalną deformacją witki plemnika. U każdego z tych mężczyzn stwierdzono istotny wzrost poziomu aneuploidii [214].

Dane literaturowe dotyczące poziomu aneuploidii chromosomów w plemnikach mężczyzn z teratozoospermia, ograniczone są do około 60 przypadków z „polimorficzną teratozoospermia”, 9 przypadków z globozoospermia oraz 12 przypadków z zespołem dużych główek. U mężczyzn z „polimorficzną teratozoospermia” plemniki wykazywały więcej niż jeden typ nieprawidłowości. W plemnikach tej grupy mężczyzn stwierdzano jedynie niewielki, ale statystycznie istotny wzrost częstości aneuploidii analizowanych chromosomów (badano chromosomy 1, 7, 8, 12, 13, 18, 21, X oraz Y) [215, 216]. W nielicznych przypadkach wykazywano negatywną korelację pomiędzy częstością aneuploidii a odsetkiem prawidłowych form plemników [202].

U mężczyzn z globozoospermia analizowano chromosomy 1, 7, 8, 9, 12, 13, 15, 18, 21, X oraz Y. Większość badań wykazała niewielki wzrost częstości aneuploidii chromosomów akrocentrycznych, X oraz Y [215]. W jednym analizowanym przypadku globozoospermii wykazano wzrost odsetka plemników z nieprawidłową strukturą chromatyny [216]. We wszystkich dotąd badanych rzadkich przypadkach nasilonej teratozoospermii z dominującą formą dużych główek stwierdzano silną korelację z podwyższoną częstością aneuploidii (50%-100%) (badano chromosomy 1, 3, 8, 11, 12, 17, 18, X oraz Y) [215, 217, 218, 219] oraz z uszkodzeniami struktury chromatyny [220]. W związku z tym, że obserwowano również wysoki odsetek plemników z triploidia sugerowano, iż u pacjentów tych nieprawidłowa segregacja chromosomów mejozycznych wynika z wad w cytokinezie [217].

6. Chromosomy plemników u nosicieli aberracji chromosomowych

Znaczna część badań dotyczących analizy chromosomów w plemnikach dotyczy mężczyzn będących nosicielami aberracji struktury chromosomów somatycznych, u których aberracje te nie mają efektu fenotypowego. Aberracje te „uwidaczniają się” podczas gametogenezy, bowiem powstające podczas profazy MI multiwalenty mogą w różny sposób ulegać segregacji, wytwarzając część niezrównoważonych (pod względem materiału genetycznego) gamet.

6.1. Segregacja mejozyczna chromosomów w plemnikach u nosicieli translokacji

6.1.1. Translokacje wzajemne

U większości heterozygotycznych nosicieli translokacji chromosomowej wzajemnej zrównoważonej (TCW) budowa histologiczna jąder, aktywność gametogeniczna oraz liczba plemników jest prawidłowa. Translokacje chromosomowe powodujące całkowite zahamowanie spermatogenezy występują rzadko. Najbardziej destrukcyjny wpływ na przebieg spermatogenezy wydaje się mieć nosicielstwo takich translokacji, w których punkt złamania chromosomu leży blisko centromeru oraz translokacji z udziałem chromosomu akrocentrycznego. W większości tych przypadków występuje azoospermia lub oligozoospermia [221, 222, 223, 224, 225]. Najczęś-

kiej azoospermia u nosicieli TCW jest konsekwencją zahamowania gametogenezy na etapie I podziału mejozy [224, 226, 227]. Niepłodni są również nosiciele translokacji między chromosomem X i autosomem. W przypadku translokacji z udziałem chromosomu Y niepłodność zależy prawdopodobnie od lokalizacji punktów pęknięcia na tym chromosomie. Większość TCW nie powstaje *de novo* tylko jest odziedziczona po jednym z rodziców [228].

U nosicieli TCW ryzyko związane z rozrodem jest przede wszystkim wynikiem powstawania podczas gametogenezy niezrównoważonych genetycznie gamet. Podczas mejozy chromosomy zaangażowane w translokację tworzą kwadriwalenty i w konsekwencji chromosomy ulegają segregacji do dwóch komórek potomnych na pięć sposobów, prowadząc do powstania 16 różnych kariotypów plemników (tzw. segregantów). W wyniku zajścia segregacji naprzemiennej powstają plemniki normalne i genetycznie zrównoważone, natomiast pozostałe typy segregacji: przyległa I i II, 3:1 (trzeciorzędowa i wymienna) oraz 4:0 prowadzą do powstania plemników niezrównoważonych genetycznie.

Sugeruje się ponadto, że u nosicieli translokacji TCW (podobnie jak i u nosicieli translokacji roberstonowskich i inwersji) dodatkowym czynnikiem zwiększającym ryzyko związane z rozrodem może być podwyższony poziom fragmentacji DNA w plemnikach (kilkakrotnie wyższy niż w plemnikach kontrolnych) [129, 188]. Stwierdzono, że u znacznej części nosicieli aberracji dotyczących struktury chromosomów występuje wysoki odsetek plemników zarówno z fragmentacją DNA, jak i z markerami apoptozy [229, 230]. Jednocześnie poziom fragmentacji DNA w plemnikach nie wykazuje korelacji ani z odsetkiem niezrównoważonych genetycznie gamet, ani z wiekiem nosiciela [230].

Dotychczas analizowano chromosomy w plemnikach u około 140 nosicieli ponad 120 różnych TCW [111, 228, 231, 232, 233]. W około 40 przypadkach chromosomy metafazowe plemnika barwiono Giemzą (po penetracji do oocytów chomika), w pozostałych przypadkach zastosowano FISH do jąder plemnika, u sześciu nosicieli zastosowano obydwie metody. W badaniach tych określano tzw. wzór segregacji mejozy, tzn. proporcje

między kariotypami plemnikowymi, pochodzącymi z poszczególnych typów segregacji. W tabeli 2. przedstawiono średnie częstości oraz zakres częstości poszczególnych typów segregacji w plemnikach wszystkich dotąd badanych nosicieli TCW. Różnice w średnich wartościach pomiędzy metodą kariotypowania a FISH wynikają nie tylko z różnej liczby analizowanych plemników, ale także z faktu, że nie dotyczą tych samych translokacji. Prawdopodobnie jednak, pewien „nadmiar” segregantów 3:1 uzyskiwanych w metodzie FISH jest artefaktem i wynika z trudności z interpretacją w plemnikach sygnałów hybrydacyjnych pochodzących od małych sond telomerowych [231, 234].

Można zauważyć, że u nosicieli TCW średnio ponad połowa plemników jest niezrównoważona genetycznie [228, 231, 235]. Dane przedstawione w tabeli 2. wskazują na fakt, że powstawanie niezrównowazenia genetycznego podczas mejozy jest wysoce zmienne w różnych translokacjach. Jednocześnie jednak, u większości nosicieli TCW procent normalnych/zrównoważonych plemników zawiera się w granicach od 35% do 50% [231, 232]. Znaczna część autorów jest zdania, iż każda translokacja wzajemna ma swój specyficzny wzór segregacji, który zależy od wielu czynników. Do czynników tych należy rodzaj chromosomów zaangażowanych w translokację i lokalizacja miejsc pęknięć (długość interstycjalnych i translokowanych fragmentów), charakterystyka tworzonego przez chromosomy kwadriwalentu, zdolność do kompletnej asocjacji synaptycznej chromosomów zaangażowanych w translokację z chromosomami homologicznymi, liczba i pozycja chiazmy oraz rozpoznawanie centromerów chromosomów homologicznych przez mikrotubule wrzeciona kariokinetycznego [228, 236]. Segregacja mejozy u nosicieli TCW na pewno nie jest procesem do końca wyjaśnionym.

Średnia częstość niezrównoważonych genetycznie plemników u nosicieli TCW translokacji jest znacznie wyższa (około 56%) niż częstość stwierdzanych niezrównoważeń u płodów z heterozygotycznymi translokacjami (średnio 10%). Sugeruje się, że prezygotyczna selekcja przeciwko genetycznie niezrównoważonym plemnikom nie występuje a częste u nosicieli wzajemnych translokacji niepowodzenia rozrodu wynikają głównie

Tab. 2. Średnie częstości oraz zakresy dla określonego typu segregacji mejozy u wszystkich dotąd analizowanych nosicieli TCW (metoda kariotypowania oraz trójkolorowy FISH) [228, 231]

Tab. 2. Average frequencies and ranges of a specific type of meiotic segregation in all TCW carriers analyzed so far (the karyotyping method and a tri-color FISH, [228, 231])

Typ segregacji	Metoda			
	kariotypowanie		FISH	
	Średnia częstość plemników (%)	Zakres częstości (%)	Średnia częstość plemników (%)	Zakres częstości (%)
Naprzemienne	43,9	27,9 – 77,2	42,5	18,6 – 62,8
Przyległa I	36,7	12,7 – 63,4	26,6	3,7 – 44,1
Przyległa II	13,6	1,9 – 31,4	12,4	0,7 – 40,1
3:1	4,8	0 – 21	14,5	1,5 – 46,8
4:0	0,1	0 – 4	0,2	0 – 0,8

z eliminacji zygot, bądź zarodków [237, 238, 239, 240]. W zależności od wielkości niezrównoważonego genetycznie odcinka zahamowanie rozwoju może wystąpić w każdym okresie życia płodowego i w konsekwencji prowadzi do poronień samoistnych, martwych urodzeń i zgonów noworodków [228, 236].

Wykazano, że wzór segregacji meiotycznej, badany u tego samego nosiciela po upływie kilku miesięcy, a następnie kilku lat, pozostawał taki sam [241].

U około 44% nosicieli TCW obserwowane jest zjawisko tzw. efektu interchromosomowego, czyli podwyższonej częstości disomii chromosomów niez zaangażowanych w translokację [228, 231]. Jak dotychczas, wyniki badań dotyczące tego zjawiska prowadzone były tylko u około 60 nosicieli TCW i nie są jednoznaczne [232, 242, 243]. Metodą kariotypowania chromosomów plemnika w stadium metafazy w ogóle nie obserwowano efektu interchromosomowego [244], natomiast w badaniach metodą FISH występuje u około 60% nosicieli [111]. Nie wiadomo, których chromosomów i których translokacji zjawisko to miałoby dotyczyć. Sugerowano, iż efekt interchromosomowy występuje znacznie częściej u nosicieli TCW z nieprawidłowymi cechami ejakulatu, choć i ta obserwacja nie jest regułą [111, 245, 246]. Wpływ efektu interchromosomowego na aneuploidię u embrionów także stanowi przedmiot kontrowersji [231, 247, 248].

6.1.2. Translokacje robertsonowskie

Wśród mężczyzn z niepowodzeniami rozrodu translokacje robertsonowskie (od nazwiska W.R.B. Robertsona) występują z częstością około 0,8% [249]. Translokacja robertsonowska (TR) jest połączeniem centrycznym ramion długich dwóch chromosomów akrocentrycznych i różni się w swej strukturze od translokacji wzajemnej (nosiciel TR ma 45 chromosomów). W większości przypadków miejsca pęknięć są zlokalizowane tuż powyżej centromeru. Dlatego powstaje pojedynczy chromosom z dwoma centromerami (dicentryczny), z których jeden traci kształt przewężenia i pozostaje nieaktywny. Powstający jednocześnie fragment bez centromeru (acentryczny) ulega utracie w trakcie kolejnych podziałów komórkowych. Podczas gametogenezy, w pachytenie I podziału meiotycznego, na skutek parowania homologicznych odcinków powstają struktury złożone z trzech chromosomów (triwalent). W anafazie te trzy chromosomy ulegają rozejściu do gamet dając typ segregacji naprzemiennej, przyległej lub 3:0. Zapłodnienie plemnikiem powstałym po segregacji przyległej lub 3:0 prowadzi do trisomii lub monosomii u zygot, z których większość ulega wczesnej eliminacji [250]. Najczęściej translokacje robertsonowskie występują z udziałem chromosomów 13 i 14 oraz 14 i 21 [20]. Około połowę przypadków TR stanowią translokacje powstałe *de novo*.

Niezrównoważone chromosomowo potomstwo u nosicieli TR występuje rzadko, natomiast u wielu nosicieli występuje oligoasthenoteratozoospermia o różnym nasileniu [251].

Dotychczas analizowano chromosomy plemników u ponad 70 nosicieli różnych TR: der(13;14), der(13;15), der(13;21), der(13;22), der(14;15), der(14;21), der(14;22) i der(21;22) [111, 231]. U nosicieli der(13;14) oraz der(14;21) (najwięcej analiz dotyczyło właśnie tych przypadków) częstość normalnych i genetycznie zrównoważonych plemników wynosiła około 86% (w zakresie od około 73% do 93%), u nosicieli innych TR była w zakresie od 60% do 97% [251]. Średnio, u większości nosicieli różnych TR częstość niezrównoważonych genetycznie segregantów nie przekracza 15%. U większości badanych nosicieli proporcja plemników normalnych i zrównoważonych genotypowo wynosiła około 1:1. Częstość plemników po segregacji 3:1 wynosiła od 0 do 1%. U nosicieli homologicznych translokacji np. der(21;21), der(13;13) wszystkie plemniki wykazywały disomię albo nullisomię danego chromosomu [252, 253]. Wydaje się, że w porównaniu do nosicieli TCW, wyniki dotyczące wzorów segregacji meiotycznej u nosicieli TR są bardziej jednorodne, niezależnie od zaangażowanych w translokację chromosomów [231].

U około 58% nosicieli RT (21 przypadków z 36 badanych) stwierdzono występowanie efektu interchromosomowego, ale, podobnie jak w przypadku nosicieli translokacji TCW, wyniki te trudno jest generalizować. Większość badanych nosicieli RT miała obniżone parametry ejakulatu, w trzech przypadkach z normozoospermia efekt interchromosomowy nie występował [111, 231, 231, 254].

Nosiciele translokacji robertsonowskich są często nieplodni (w znaczeniu: brak koncepcji), ale zdarza się czasami, że są synami i braćmi płodnych nosicieli tej samej translokacji. Stąd trudno jednoznacznie oceniać wpływ tych translokacji na nieplodność.

6.2. Chromosomy plemników u nosicieli inwersji

6.2.1. Nosiciele inwersji pericentrycznych

Częstość inwersji pericentrycznych (centromer zlokalizowany w obrębie odwróconego odcinka chromosomu) wynosi w ogólnej populacji nowonarodzonych dzieci od 1 do 2%. Wśród ogółu mężczyzn z niepowodzeniami rozrodu częstość ta jest 13 razy większa [112]. Większość opisanych przypadków inwersji pericentrycznych dotyczy chromosomu 2 oraz inwersji heterochromatyny okołocentromerowej chromosomów 1, 9, 16, oraz Y, które uznawane są jako heteromorfizmy (warianty polimorficzne chromosomów) [234].

Podczas profazy MI chromosom z inwersją pericentryczną i jego prawidłowy homolog tworzą biwalent. W zależności od długości odwróconego odcinka [255] względnie, według innej koncepcji, w zależności od lokalizacji miejsc pęknięć w obrębie euchromatyny lub heterochromatyny [256], w biwalencie może wystąpić brak koniugacji (asynapsis), koniugacja niehomologiczna (heterosynapsis) względnie koniugacja homologiczna (homosynapsis) w przypadku powstania tzw. pętli inwer-

syjnej [257]. Brak homologicznej koniugacji uniemożliwia rekombinację, zatem w anafazie do połowy plemników trafia chromosom prawidłowy a do pozostałych chromosom z inwersją. Brak rekombinantów stwierdza się, gdy odwrócony odcinek obejmuje < 30% długości chromosomu (niezależnie od wielkości fragmentu, który uległ inwersji) [258]. Jednak konsekwencją asynapsis mogą być zaburzenia w przebiegu mejozy [234]. Koniugacja homologiczna umożliwia zajście rekombinacji w obrębie odwróconego odcinka, prowadząc w konsekwencji do powstania dwóch jednocentromerowych chromosomów z duplikacją i delecją. Dotychczas analizowano chromosomy plemników u około 30 nosicieli różnych inwersji pericentrycznych [242, 259]. Częstość zrekombinowanych nie zrównoważonych genetycznie plemników wynosiła od 0 do 54%, przy czym dla inwersji obejmujących odcinek krótszy niż 100 Mbp i mniej niż 50% długości chromosomu były to wartości od 0 do 3,4% [231, 234, 258, 260, 261]. Wyniki te odzwierciedlają zróżnicowany wpływ inwersji na produkcję nie zrównoważonych gamet, nawet w przypadkach, kiedy inwersja dotyczy tego samego chromosomu [259].

Występowanie efektu interchromosomowego stwierdza się u około 14% nosicieli inwersji [262]. Ta stosunkowo niska częstość może wynikać z nielicznej grupy nosicieli inwersji, u których badano aneuploidię chromosomów niezaangażowanych w daną inwersję [231].

6.2.2. Nosiciele inwersji paracentrycznych

Częstość inwersji paracentrycznych (odwrócony odcinek chromosomu nie obejmuje centromeru) wynosi w ogólnej populacji nowonarodzonych dzieci od 0,002 do 0,049% [260]. Wśród nosicieli inwersji paracentrycznych, 13,4% ma niepowodzenia rozrodu (11,4% spontaniczne poronienia, 2% niepłodność).

W tych przypadkach inwersji paracentrycznych, w których w MI powstaje pętla inwersyjna i zachodzi rekombinacja, powstają fragmenty acentryczne i chromosomy dwucentromerowe zawierające duplikacje i delecje. Dotychczas analizowano chromosomy plemników u pięciu nosicieli inwersji paracentrycznej w chromosomach 2, 4, 7, 9 i 14. Częstość zrekombinowanych gamet wynosiła od 0,03 do 0,81%, co zdaje się wskazywać na rzadkie występowanie rekombinacji [234, 260].

6.3. Chromosomy plemników u nosicieli aberracji liczby i struktury chromosomów X lub Y

Badano aneuploidię chromosomów w plemnikach (uzyskiwanych najczęściej poprzez biopsję jąder) u kilkunastu mężczyzn z zespołem Klinefeltera o karyotypie 47,XXY. Stwierdzono znacząco niższy odsetek plemników z chromosomem Y w porównaniu z plemnikami z X. Częstość aneuploidii XX oraz XY była znacząco wyższa w porównaniu z kontrolnymi wynikami (2%-45%), natomiast częstość disomii YY nie różniła się od kontroli. W przypadku mężczyzn o karyotypie 47,XXY/46,XY stwierdzono podwyższoną (1,5%-7%), w stosunku do kontroli, częstość jedynie plemników z disomią XY

[149, 263, 264, 265]. W plemnikach mężczyzn o karyotypie 47,XXY podwyższona była także częstość disomii chromosomów 13,18 i 21 [266].

U mężczyzn o karyotypie 47,XXY teoretycznie połowa plemników powinna wykazywać aberracje liczby chromosomów X i Y. Najczęściej jednak, częstość aneuploidii tych chromosomów w plemnikach wynosi od 0,3% do 15% [160, 267, 268, 269, 270]. Potwierdza to sugestię, że dodatkowy chromosom Y ulega eliminacji podczas gametogenezy [271]. Jednak w przypadkach z niepłodnością regułą jest wysoki odsetek plemników z aneuploidią, będącą skutkiem błędów w pierwszym podziale mejotycznym [272]. Opisano przypadek pacjenta 47,XXY z oligozoospermia, u którego częstość plemników z aneuploidią wynosiła aż 38%, w tym połowę stanowiła aneuploidia chromosomów X i Y [273].

Po raz pierwszy w 2001 roku przedstawiono wzór segregacji mejotycznej u mężczyzny z silną oligozoospermia, będącego nosicielem translokacji wzajemnej chromosomów X i Y t(X;Y)(p22;q11). Ponad 80% plemników było nie zrównoważonych genetycznie, tym niemniej jednak proces mejozy nie ulegał zahamowaniu i możliwa była produkcja plemników zdolnych do zapłodnienia. Inni badani nosiciele takiej translokacji mieli zahamowaną mejozę na etapie pachytenu [135].

U nosiciela translokacji *de novo* t(Yp/13p) z silną oligozoospermia wykazano nieprawidłową segregację chromosomów X, Y, 13 oraz 18 w MI, w wyniku czego tylko 13,6% spermatocytów II rzędu było prawidłowych. Na tym etapie następowało jednak znaczne wyhamowanie mejozy, w konsekwencji 70% spermatyd i 85% plemników miało prawidłowe chromosomy [131].

Badano segregację mejotyczną chromosomów X i Y u mężczyzny z oligoastenoteratozoospermia o karyotypie 45,X/46,X,r(Y)/46,X,dic r(Y) [119]. W spermatocytach II rzędu częstość plemników z XY wynosiła 45%, natomiast w plemnikach była o połowę mniejsza. Ponadto częstość plemników z chromosomem X była dwa razy wyższa w stosunku do plemników z chromosomem Y.

Badano również wzór segregacji mejotycznej u dwóch nosicieli TCW z udziałem chromosomu Y: t(Y;1) oraz t(Y;16) [247, 274]. W przypadku t(Y;1) odsetek plemników nie zrównoważonych genetycznie wynosił 64%, w przypadku t(Y;16) – 49%. W obu przypadkach większość nie zrównoważonych segregantów była wynikiem segregacji przyległej I, natomiast nie było produktów segregacji przyległej II.

6.3.1. Chromosomy plemników u mężczyzn z mikrodelecjami chromosomu Y

Dotychczas jedynie u kilkunastu niepłodnych mężczyzn z mikrodelecjami w regionie AZF chromosomu Y badano poziom aneuploidii w plemnikach metodą FISH [148, 149]. Stwierdzono istotny wzrost częstości plemników z nullisomią 22,-X i 22,-Y oraz disomią 24,XY, bez znaczącego wzrostu częstości plemników z disomią 24,XX lub 24,YY. Znaczącej redukcji ulegał również odsetek prawidłowych plemników 23,Y. Zaobserwowa-

ne różnice były statystycznie istotne nie tylko w porównaniu z wynikami grup kontrolnych płodnych mężczyzn, ale również z wynikami mężczyzn z oligozoospermia bez mikrodelecji w chromosomie Y [149]. Sugeruje się, iż mikrodelecje w chromosomie Y mogą mieć wpływ na przebieg mejozy, prowadząc do wzrostu częstości nondysjunkcji bivalentów XY [149].

6.4. Chromosomy markerowe a męska niepłodność

Małe, strukturalnie nieprawidłowe, dodatkowe chromosomy markerowe występują w ogólnej populacji nowonarodzonych dzieci z częstością około 0,04%, a u osób upośledzonych umysłowo z częstością około 0,43% [275, 276, 277]. Chromosomy markerowe, ze względu na swą ogromną morfologiczną różnorodność oraz mozaikowość występowania (ponad 50% przypadków) stanowią prawdziwe wyzwanie dla cytogenetyków-klinicystów [277]. Jedynie około 30% przypadków nosicielstwa chromosomu markerowego można powiązać ze specyficznym obrazem klinicznym znanych zespołów: i(12p) (PKS = zespół Pallistera Killiana, inv dup(22) (CES = zespoły „kociego oka”), zespół i(18p) oraz zespół der(22). W pozostałych przypadkach około 30% chromosomów markerowych pochodzi z chromosomu 15 (połowa nosicieli mar der(15) jest zdrowa). W sumie szacuje się, że około 8% nosicieli chromosomów markerowych różnego pochodzenia nie wykazuje żadnych objawów klinicznych [277].

Wpływ chromosomów markerowych na niepowodzenia rozrodu nie jest jednoznacznie określony. Niektórzy autorzy, poszukując zależności między fenotypem a genotypem u nosicieli chromosomów markerowych, w ogóle nie rozpatrują problemu niepłodności nosicieli zakładając, że jej przyczyna może być wieloczynnikowa i niekoniecznie związana z obecnością chromosomu markerowego [277, 278]. Sugestie dotyczące występowania asocjacji pomiędzy niepłodnością a nosicielstwem dodatkowych chromosomów markerowych wynikają przede wszystkim z danych statystycznych, bowiem obserwowano wyższą (0,17%-0,3%), w stosunku do grupy kontrolnej, częstość występowania chromosomów markerowych u niepłodnych mężczyzn [114, 274, 277, 279, 280, 281, 282, 283, 284]. Można by domniemywać, iż chromosomy markerowe mogą zaburzać spermatogenezę poprzez zakłócanie koniugacji i dysjunkcji homologicznych chromosomów podczas mejozy [285]. Z drugiej jednak strony, chromosomy markerowe występują także u płodnych mężczyzn. Analiza doniesień literaturowych wskazuje, że asocjacja pomiędzy obecnością chromosomu markerowego a niepłodnością dotyczy na pewno nosicieli dwóch bisatelitarnych chromosomów markerowych: w tych przypadkach wszyscy nosiciele byli niepłodni [286].

Segregację meiotyczną chromosomu markerowego badano tylko w kilku przypadkach [184, 274, 278, 287]. U dwóch płodnych, niespokrewnionych mężczyzn, nosicieli chromosomu markerowego nieznanego pochodzenia, stwierdzono, zgodnie z teoretycznym oczekiwaniem,

segregację meiotyczną 1:1 [184]. W trzech pozostałych przypadkach chromosom markerowy określono jako pochodny der(15) [274, 287]. U jednego z tych nosicieli stwierdzono segregację meiotyczną zbliżoną do 1:1 [274]. W dwóch przypadkach chromosom markerowy der(15) występował odpowiednio w 6,23% i w 26% plemników, co mogło być, jak sugerują autorzy, wynikiem albo występowania mozaicyzmu tkankowego, albo wynikiem selekcji w trakcie spermatogenezy [278, 287]. Jednocześnie stwierdzono, że w gametach nie zachodziła preferencyjna segregacja chromosomu markerowego z chromosomem X lub Y [278]. U niektórych nosicieli chromosomu markerowego możliwe jest występowanie efektu interchromosomowego [278].

6.5. Zaburzenia w mejozie a niepłodność – hipotezy i spekulacje

Na podstawie badań cytogenetycznych wysunięto hipotezy dotyczące bezpośredniego związku pomiędzy prawidłowym „zachowaniem się” chromosomów X i Y podczas I podziału meiotycznego a powstawaniem plemników zdolnych do zapłodnienia.

Podczas prawidłowo przebiegającego podziału meiotycznego w spermatocytach, w trakcie pachytenu, tworzące bivalent chromosomy X i Y są transkrypcyjnie nieaktywne (ulegają heterochromatyzacji, w przeciwieństwie do chromosomów autosomowych), a koniugacja między nimi jest ograniczona do tzw. regionu pseudoautosomalnego [288, 289]. W 1972 roku Lifschytz [290] spekulował, że właśnie prawidłowa inaktywacja chromosomu X może być niezbędnym warunkiem normalnej spermatogenezy u ssaków. Postulowano nawet, że produkty genów chromosomu X mogą być inhibitorami spermatogenezy. Dziesięć lat później sugerowano, że reaktywację niektórych fragmentów chromosomu X mogłyby powodować asocjacje XY-chromosomy autosomowe [291]. W badaniach z użyciem genetycznych modeli samców myszy będących nosicielami translokacji między chromosomami autosomowymi a X stwierdzono jednak, że różne aberracje strukturalne chromosomu X, względnie brak koniugacji pomiędzy X i Y, nie powodowały reaktywacji chromosomu X. Natomiast w późniejszych badaniach, w których analizowano przebieg syntezy RNA w pierwotnych spermatocytach u nosicieli translokacji X;16, wskazano raczej na odwrotne zjawisko. Stwierdzono mianowicie, że obniżenie żywotności spermatocytów zachodzi w rezultacie „rozprzestrzeniania się” inaktywacji chromosomu X na chromosomy autosomowe [227, 292, 293, 294].

Obecnie przyjmuje się, że do zapłodnienia zdolne są tylko te plemniki, w których podczas pachytenu powstawała koniugacja między tzw. regionami pseudoautosomalnymi chromosomów X i Y, dodatkowo zachodziła w tym regionie rekombinacja, a niezwiązane synapsą regiony bivalentu XY były nieaktywne transkrypcyjnie [289, 295]. Wykazano, że zaburzona inaktywacja bivalentu XY prowadzi do apoptozy spermatocytów [296]. Wiadomo także, że w trakcie spermatogenezy następuje selektywna utrata komórek zawierających nieskoniugowane chromosomy X oraz Y

(tzw. uniwalenty). Wykazano, że w spermatocytach w diakinizie wszystkie zaobserwowane uniwalenty chromosomów X i Y były niezrekombinowane, natomiast we wszystkich spermatocytach, które osiągnęły metafazę II chromosomy X i Y były zrekombinowane. Dlatego właśnie sugeruje się, że również wystąpienie rekombinacji między X i Y jest niezbędnym warunkiem prawidłowej spermatogenezy [159, 227]. Natomiast molekularne podstawy zaburzeń w formowaniu się biwalentów XY są dopiero w trakcie poznawania [176, 296, 297, 298, 299].

Na podstawie badań morfologicznych nad przebiegiem mejozy wysunięto kilka hipotez dotyczących przyczyn obniżonej płodności mężczyzn będących nosicielami różnych aberracji chromosomów. Otóż z wielu obserwacji wynika, że istnieje korelacja pomiędzy zaburzeniami w przebiegu spermatogenezy a częstością asocjacji XY-chromosomy autosomowe [224, 300, 301]. Takie asocjacje, możliwe w sytuacjach powstawania asynapsis między autosomami, mogą interferować z inaktywacją chromosomu X [301]. Trzeba zaznaczyć, że nawet w prawidłowo przebiegającej mejozie w pachytenie, w około 30% jąder komórkowych obserwowano, że biwalenty chromosomów 9 (heterochromatyna 9q), 13 (cały), 15 (15p), 19 (cały) oraz 21 (21p), przylegają bezpośrednio do biwalentów X-Y [224]. W przypadku chromosomu 15 sugeruje się, iż może to być konsekwencją znacznej homologii sekwencji heterochromatyny telomerowej chromosomu 15 i heterochromatyny w regionie Yq. Homologia ta mogłaby tłumaczyć stosunkowo wysoką częstość występowania translokacji pomiędzy chromosomami 15 i X lub Y [302]. Właśnie w profazie MI u nosicieli translokacji wzajemnych dotyczących chromosomów akrocentrycznych asocjacje XY-chromosomy autosomowe występują z największą częstością [222]. Część tych nosicieli jest mimo to płodna. Ale zwraca się uwagę na fakt, że w przypadkach dotyczących nosicielstwa trisomii chromosomu akrocentrycznego, kiedy to w mejotycznej asocjacji XY-chromosom autosomowy bierze udział dodatkowy chromosom akrocentryczny, wszyscy mężczyźni są nieplodni (np. mężczyźni 47,XY,+21 czyli z zespołem Downa). Niektórzy autorzy sugerowali, że u tych mężczyzn nieplodność powstaje w wyniku niemożności zajścia koniugacji w profazie mejozy pomiędzy chromosomami tworzącymi asocjację [300, 303, 304]. Z kolei inni autorzy uważali, że zasadniczą rolę w zaburzeniach spermatogenezy odgrywa faktycznie brak koniugacji w pachytenie pomiędzy chromosomami autosomowymi, ale będący skutkiem pęknięć chromosomów. Pęknięcia są najczęstszą aberracją strukturalną. Wydaje się, że powyższe hipotezy wzajemnie się uzupełniają, bowiem sugeruje się, że każde wystąpienie asocjacji XY-chromosomy autosomowe jest poprzedzone pęknięciem chromosomów i powstaniem asynapsis [292, 303]. W nowszych publikacjach, przedstawiano kompleksy synaptonemalne uwidaczniane metodą immunocyto-genetyczną, u nosicieli translokacji wzajemnych z udziałem chromosomu akrocentrycznego zarówno o prawidłowej spermatogenezie (nosiciel t(10;14)), jak i z azoospermia (nosiciele t(13;20), t(11;14), t(8;13) oraz t(1;21)) [221, 222, 224, 225]. Jedynie u nosicie-

li z azoospermia obserwowano występowanie asocjacji biwalentów XY z kwadriwalentami autosomów objętych translokacją oraz obniżoną częstość rekombinacji. Co ciekawe, jednocześnie stwierdzono, że u nosiciela t(13;20) obserwowane w pachytenie asocjacje biwalentów XY z kwadriwalentami chromosomów autosomowych nie miały wpływu na prawidłowo przebiegającą kondensację biwalentów XY i inaktywację chromosomu X, natomiast zauważono heterochromatynizację fragmentu chromosomu autosomowego [224]. Badano także kompleksy synaptonemalne w mikroskopie elektronowym u płodnego nosiciela t(11;18)(q13.3;q23) [305]. Mimo iż w większości kwadriwalentów w pachytenie występowały miejsca z brakiem lub heterologicznymi synapsami, nie stwierdzono asocjacji ani z biwalentami XY, ani z innymi biwalentami [305]. Z kolei w przypadku nosiciela t(Y;1) z azoospermia, u którego kompleksy synaptonemalne cechowały się znaczną redukcją miejsc rekombinacji sugerowano, że nieplodność mogła być wynikiem represji transkrypcji genów obecnych na części chromosomu 1 i odpowiedzialnych za koniugację chromosomów [306].

W przypadkach nieplodności związanych z kariotypem 46,XY,Y sugeruje się, że nieplodność może być następstwem selektywnej utraty komórek, w których podczas pachyteny zachodziła koniugacja między YY, uniemożliwiająca prawidłową inaktywację Y [295].

W przypadkach nieplodności stwierdzanej u nosicieli dwóch bisatelitarnych chromosomów markerowych spekuluje się, iż może być ona związana z nadmiarem w genomie konstytutywnej heterochromatyny, czyli tzw. efektem dawki. Otóż, niezależnie od mechanizmów powstawania bisatelitarnych chromosomów markerowych, zasadniczo składają się one z konstytutywnej heterochromatyny. Trzeba tu zaznaczyć, że biologiczna rola heterochromatyny pozostaje wciąż niewyjaśniona, a znaczna część danych pochodzi z badań nad genetyczną funkcją kilku heterochromatynowych regionów w chromosomach muszki owocowej *Drosophila melanogaster*. W ludzkiej konstytutywnej heterochromatynie miałyby znajdować się miejsca docelowe dla hipotetycznych ligandów, syntetyzowanych w stałych ilościach, niezależnie od zawartości heterochromatyny w komórce. W przypadku obecności nadmiaru heterochromatyny pochodzącej z chromosomów markerowych, z braku dostatecznej ilości ligandów, część miejsc wiązania na DNA pozostawałaby nie zajęta. To niezrównoważenie mogłoby mieć wpływ na pewne funkcje komórki, np. dojrzewanie komórek płciowych [286].

II. ZAŁOŻENIA I CEL PRACY

Jądro komórkowe ludzkiego plemnika stanowi unikatowy model do porównania wewnątrzjądrowej organizacji aktywnego diploidalnego genomu w stosunku do haploidalnego genomu nieaktywnego. Chromatyna w plemniku jest wysoce skondensowana i upakowana w 23 nukleoproteiny chromosomy, w których nie zachodzi ani replikacja, ani transkrypcja. Badania ostatnich lat wykazały, że architektura wewnątrzjądrowa plemnika jest specyficzna:

centralnym elementem jest organizacja chromatyny indywidualnych chromosomów w postaci wyodrębnionych obszarów, tzw. terytoriów (CT), które mają nieprzypadkowe umiejscowienie. Chromosomy w obrębie swego terytorium wykazują konfigurację „wsuwki do włosów”. Centromery chromosomów plemnika są skierowane do wnętrza jądra, gdzie grupują się tworząc wyodrębniony obszar zwany „chromocentrum”. Natomiast telomery ramion p oraz q tego samego chromosomu tworzą dimery umiejscowione peryferyjnie. Funkcjonalne znaczenie tej swoistej topologii pozostaje do wyjaśnienia, sugeruje się jednak, że jest ona niezbędna do prawidłowego ukształtowania się przedjądra męskiego a w konsekwencji prawidłowego rozwoju zygoty.

Analiza chromosomów w plemnikach zarówno u płodnych mężczyzn, jak i niepłodnych mężczyzn o prawidłowym kariotypie somatycznym, jak również u nosicieli aberracji chromosomów somatycznych, dostarcza informacji o tych strukturalnych i liczbowych aberracjach, które uniknęły wyeliminowania w trakcie mejozy. U zdrowych płodnych mężczyzn takie aberracje występują średnio w kilku procentach plemników, u mężczyzn z niepowodzeniami rozrodu średnia częstość aberracji jest istotnie wyższa. Uważa się, że podwyższona częstość aneuploidii w plemnikach może być jednym z wykładników zaburzonego procesu spermatogenezy, stąd zjawisku temu przypisuje się dużą rolę w etiologii niepowodzeń rozrodu. Natomiast wydaje się, iż prawdopodobnie nie występują proste korelacje między częstością i typem aberracji chromosomów plemnikowych a określonym typem niepłodności. Prawdopodobnie brak również takiej korelacji między kariotypem pojedynczego plemnika a jego morfologią i/lub ruchliwością. Typowe dla nosicieli translokacji (TCW) niepowodzenia rozrodu, wynikające głównie z eliminacji nie zrównoważonych genetycznie zarodków i z poronień samoistnych, są konsekwencją braku prezygotycznej selekcji plemników z nieprawidłowym genotypem.

Celem przedstawionych w niniejszej monografii danych literaturowych było omówienie aktualnego stanu wiedzy wynikającego z badań cytogenetycznych komórek somatycznych oraz plemników u niepłodnych mężczyzn. W monografii przedstawiono także badania własne dotyczące pośrednio oraz bezpośrednio chromosomów w plemnikach mężczyzn z niepowodzeniami rozrodu.

Cele badań były następujące:

I. Ocena zdolności plemników do zapłodnienia w powiązaniu z analizą cytogenetyczną oraz podstawowymi parametrami nasienia. Do realizacji tego celu zastosowano test *in vitro* ksenogenicznej penetracji plemników do oocytów chemicznych.

II. Analiza wpływu mitotycznej niestabilności na spermatogenezę. Cel ten realizowano poprzez poszukiwanie asocjacji pomiędzy aneuploidią chromosomów w jądrach komórek somatycznych w interfazie a aneuploidią chromosomów w plemnikach.

III. Określenie związku pomiędzy wzorem segregacji meiotycznej chromosomów plemnikowych u nosicieli translokacji wzajemnych (zrównoważonych) a niepowodzeniami rozrodu. Cel ten realizowano poprzez poznanie wzorów

segregacji meiotycznej w kilku nieopisanych wcześniej translokacjach oraz porównanie wyników z danymi rodowodowymi, a w jednym przypadku także z danymi z diagnostyki przedimplantacyjnej. Porównano również wzory segregacji meiotycznej u ojca i syna, nosicieli tej samej translokacji rodzinnej. Ponadto badano segregację meiotyczną chromosomu markerowego w przypadku kariotypu 46,XY[96]/47,XY+mar[4].fish der(20).

IV. Odpowiedź na pytanie, czy zaburzonej spermatogenezie towarzyszą zmiany w wewnątrzjądrowej topologii chromosomów plemnikowych. Cel ten realizowano poprzez badanie pozycji centromerów wybranych chromosomów plemnikowych w chromocentrum plemników nosicieli translokacji chromosomowych wzajemnych, plemników z wysokim poziomem aneuploidii, plemników frakcjonowanych i plemników odpłukanych z powierzchni oocytów. Dodatkowo sprawdzono, czy potwierdzona dla większości chromosomów plemnikowych konformacja „wsuwki do włosów” cechuje również chromosom Y.

III. MATERIAŁ I METODY

1. Materiał biologiczny

Materiał biologiczny stanowiły ludzkie plemniki, krew obwodowa od mężczyzn i kobiet (współmałżonek) oraz oocyty chemiczne.

Mężczyźni z grupy kontrolnej byli płatnymi dawcami lub ochotnikami. Mężczyźni z niepowodzeniami rozrodu zgłaszali się do poradni leczenia niepłodności w Poznaniu, gdzie przyjmowani byli celem diagnostyki niepowodzeń rozrodu lub konsultacji medycznych (prof. M. Kurpisz). Mężczyźni z azoospermią byli pacjentami Kliniki Niepłodności i Endokrynologii Rozrodu Katedry Ginekologii i Położnictwa Uniwersytetu Medycznego w Poznaniu (prof. P. Jędrzejczak). Kontakt z większością nosicieli translokacji chromosomowych wzajemnych nawiązano poprzez współpracę z Zakładem Genetyki Klinicznej Akademii Medycznej w Białymstoku (prof. A.T. Midro). Kontakt z niektórymi pacjentami nawiązano poprzez współpracę z Zakładem Genetyki Medycznej Uniwersytetu Medycznego w Poznaniu (prof. A. Latos-Bieleńska). Osoby, od których uzyskano ejakulat i/lub krew obwodową były wcześniej poinformowane o celu zamierzonych badań i zapoznane z wynikami bezpośrednio ich dotyczącymi.

1.1. Plemniki

Ejakulatory do badań pozyskiwane były poprzez masturbację po okresie minimum 4-dniowej abstinencji płciowej.

1.2. Krew obwodowa

Krew żylną pobierano jałowo do standardowych próbek z heparyną litową. Hodowle zakładano w dniu pobrania krwi lub przechowywano w lodówce nie dłużej niż 4 dni.

1.3. Oocyty chomika

Oocyty chomika uzyskiwano z samic chomika syryjskiego (*Mesocricetus aureatus*) w wieku od 2 do 6 miesięcy. Chomiki kupowano od hodowcy (firma „Akwapoz”) w wieku 6-7 tygodni, do terminu doświadczeń zwierzęta przebywały w zwierzętarni Instytutu Genetyki Człowieka PAN, w osobnym pomieszczeniu o ustalonej temperaturze 23°C. W pomieszczeniu tym przez 14 godzin było jasno (od godziny 8.00 do 22.00) i 10 godzin ciemno.

1.3.1. Zezwolenie na prowadzenie doświadczeń na zwierzętach

Doświadczenia z wykorzystaniem oocytów chomiczych wykonywano na podstawie następujących dokumentów: imiennych Zezwoleń (Nr 1 z dnia 23.10.2000, oraz Nr 15 z dnia 12.09.2006) na wykonywanie doświadczeń na zwierzętach laboratoryjnych w ramach działalności Instytutu, wydanych przez Dyrektora Instytutu Genetyki Człowieka PAN; imiennej zgody (DB/KKE/PL-15 z dnia 18.04.2001) na przeprowadzanie doświadczeń na zwierzętach wydanej przez Krajową Komisję Etyczną do Spraw Doświadczeń na Zwierzętach przy Komitecie Badań Naukowych oraz Uchwały NR 47/2006 z dnia 14 listopada 2006 Lokalnej Komisji Etycznej do Spraw Doświadczeń na Zwierzętach w Poznaniu.

2. Metody

Bufory i płyny hodowlane

- a)** Płyn do hodowli limfocytów krwi obwodowej: płyn hodowlany Eagle’a 1959 (MEM), 15% inaktywowana surowica cielęca, L-glutamina (200 mM), penicylina 100 j./ml, 0,2 ml LF/4 ml hodowli (liofilizat z ekstraktu fasoli *Phaseolus vulgaris*, czynnika mitogennego dla limfocytów T).
- b)** Utrwalacz Carnoy’a:
metanol: kwas octowy lodowaty w stosunku 3:1
- c)** Bufor Sørensen:
bufor A+B w stosunku 1:1; bufor A = KH_2PO_4 : 9,07 g/l, bufor B = Na_2HPO_4 : 23,87 g/l.
- d)** Bufor cytrynianowy SSC 20 x stężony (roztwór wyjściowy):
1 litr zawiera 175,3 g chlorku sodu (NaCl), 88,2 g cytrynianu sodu ($\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7\text{Na}_3$), pH 7,0
Bufor 2 x SSC: 10 ml 20 x SSC, 90 ml H_2O
Bufor 0,4 x SSC: 2 ml 20 x SSC, 98 ml H_2O
Bufor 2 x SSC, 0,05% Tween 20: 100 ml 2 x SSC, 50 μl Tween 20
- e)** Bufor hybrydyzacyjny:
50% formamid, 10% siarczan dekstranu, 2 x SSC.
- f)** DAPI:
0,125 $\mu\text{g/ml}$ DAPI (4,6-diamidino-2-fenylindole)
- g)** Płyn podstawowy Biggersa-Whittena-Whittinghama (BWW) [307]:
1 litr zawiera: 5,540 g NaCl , 0,356 g KCl , 0,189 g CaCl_2 , 0,162 g KH_2PO_4 , 0,294 g $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 1 g D-glukozy, 0,028 g pirogromianu sodowego, 10 ml 2M buforu Hepes, 10 ml 2M buforu Hepes w 3M NaOH , 0,5 ml 1% czer-

wieni fenolowej oraz 1 ml antybiotyków (10^5 j./ml penicyliny i streptomycyny 50 mg/ml) (pH 7,4–7,5).

Płyn roboczy BWW: 100 ml płynu podstawowego BWW zawierał dodatkowo 0,37 ml 60% DL-kwasu mlekowego, 0,216 g NaHCO_3 oraz 0,5 g ludzkiej albuminy osoczowej (Fracja V, Sigma) (pH 7,4–7,5).

h) Płyn do uzyskania frakcji plemników ‘swim-up’: płyn hodowlany Ham F10

i) Płyn do hodowli spenetrowanych oocytów chomiczych: płyn hodowlany Ham F10, 15% inaktywowanej surowicy cielęcej, penicylina 100 j./ml (pH 7,3–7,4).

Z kolcemidem: płyn Ham F10, 15% inaktywowanej surowicy cielęcej, penicylina 100 j./ml (pH 7,3–7,4), 0,4 $\mu\text{l/ml}$ kolcemidu.

j) roztwór hialuronidazy:

0,1% hialuronidaza w płynie podstawowym BWW

k) roztwór trypsyny:

0,1% trypsyna w płynie podstawowym BWW

l) bufor TTY (TES-TRIS-yolk):

100 ml buforu zawiera: 4,33 g TES, 1,03 g TRIS, 0,1 g dekstrozy, 0,1 ml antybiotyków (10^5 j./ml penicyliny i streptomycyny 50 mg/ml), 25 g świeżego żółtka jaja kurzego (pH 7,4).

2.1. Badanie kariotypu somatycznego

2.1.1. Hodowla leukocytów krwi obwodowej

Stosowano standardową metodę hodowli komórkowej poprzedzającą badanie kariotypu somatycznego: 0,3 ml pełnej krwi obwodowej w 4 ml podłoża hodowlanego z mitogenem roślinnym LF, inkubowano 72 godziny w 37°C, w inkubatorze z 5% zawartością CO_2 . Godzinę przed zakończeniem hodowli dodawano 0,2 $\mu\text{g/ml}$ kolcemidu, co umożliwiło nagromadzenie komórek w stadium metafazy.

2.1.2. Otrzymywanie preparatów i barwienie chromosomów

Zawiesinę komórek wirowano przez 10 minut przy prędkości 1300 obrotów/minutę. W celu rozproszenia chromosomów do osadu komórek dodawano hipotoniczny roztwór 0,4% KCL i inkubowano przez 20 minut w 37°C. Komórki utrwalano poprzez trzykrotne zawieszanie ich i inkubację w utrwalaczu Carnoya w -20°C. Preparaty sporządzano poprzez nakrapianie zawiesiny utrwalonych komórek na odtuszczone, ochłodzone, wilgotne szkiełka podstawowe. Preparaty suszono w temperaturze pokojowej, część przechowywano w -20°C.

Do rutynowej identyfikacji chromosomów stosowano standardową metodę uzyskiwania prążków G poprzez trawienie chromosomów trypsyną a następnie barwienie odczynnikami Giemzy (metoda GTG). Stosowano inkubację preparatów chromosomowych (suszonych 5–7 dni) w 0,25% zbuforowanym roztworze trypsyny (najczęściej 15–50 sekund) i 4% roztworze Giemzy w buforze fosforanowym Sørensen o pH 6,8 (10–15 minut).

W przypadkach wymagających sprawdzenia tzw. wariantów morfologicznych chromosomów (heteromorfizmów) dodatkowo stosowano standardowe barwienie prążków C i/lub NOR. Prążki C obserwowano w centromerach i regionach heterochromatyny strukturalnej chromosomów 1, 9, 16, 19, krótkich ramion akrocentryków i Y. Celem otrzymania prążków C (metoda CBG) preparaty chromosomowe (2–3-tygodniowe) inkubowano kolejno w roztworze 0,2N KCL (1 godzinę, w temperaturze pokojowej), w 5% Ba(OH)₂ (1 godzinę, w temperaturze 50°C) oraz w buforze cytrynianowym 2 x SSC, w temperaturze 60°C i barwiono 4% roztworem Giemzy (40 minut). Heteromorfizmy chromosomów akrocentrycznych obserwowano barwiąc organizatory jąderkowe (ang. NOR) w wodnym 50% roztworze azotanu srebra (10–20 minut, w temperaturze 37°C), a następnie 10 minut w 4% roztworze Giemzy.

Rutynową ocenę kariotypu dokonywano ustalając liczbę chromosomów w 20 komórkach, a w przypadku podejrzenia aberracji lub mozaicyzmu, w 50 komórkach. Szczegółowo analizowano wzór prążkowy (prążki GTG) na chromosomach pochodzących z 10–20 komórek. W pojedynczych przypadkach do identyfikacji chromosomów w limfocytach zastosowano również metodę FISH (wg procedury przedstawionej w rozdziale 2.3.3).

Chromosomy obserwowano w mikroskopie Olympus BX 41 przy powiększeniu obiektywu 100x (z olejkiem imersyjnym) (obiektyw Olympus UPlanF1). Wyniki rejestrowano i kolekcjonowano stosując kamerę (Olympus U-TV1X-2/U-CMAD3) i program komputerowy IKARUS MetaSystems (v. 5.0, Altlussheim, Niemcy). Wyniki analizy kariotypu zapisywano wzorem, według zasad przedstawionych przez ISCN [308].

2.2. Ksenogeniczna penetracja ludzkich plemników do oocytów chomika

2.2.1. Przygotowanie plemników

Ejakulat ulegał upłynnieniu przez około 30 minut w temperaturze pokojowej. Do upłynnionego ejakulatu dodawano 30 ml buforu BWB [307] i wirowano (10 minut przy prędkości 1800 obrotów/minutę). Osad zawierający plemniki płukano trzykrotnie w 20 ml BWB (7 minut przy prędkości 1800 obrotów/minutę), zawieszano w 2 ml BWB, mieszano z 2 ml buforu TTY i pozostawiano do 16-godzinnej kapacytacji w 4°C. Następnie plemniki trzykrotnie wirowano i płukano płynem BWB (7 minut przy prędkości 1800 obrotów/minutę). Plemniki doprowadzano do stężenia 5×10^6 /ml płynem BWB i w postaci kropli (0,2 ml) umieszczano w naczynkach hodowlanych, w komorze hodowlanej (37°C, 5% CO₂ i 95% wilgotność).

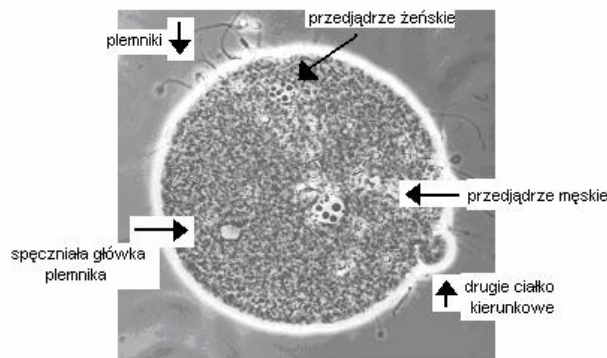
2.2.2. Przygotowanie oocytów chomika i inkubacja z plemnikami

Superowulację u samic chomika syryjskiego (*Mesocricetus aureatus*) wywoływano poprzez dootrzewną

iniekcję 40 j.m. gonadotropiny osoczowej ciężarnych kłaczy (PMSG) oraz, po 72 godzinach, iniekcję 40 j.m. ludzkiej gonadotropiny kosmówkowej (HCG). Po upływie 16 godzin izolowano i rozcinano jajowody. Uzyskane oocyty otoczone komórkami wzgórka jajonośnego inkubowano 2 minuty w 0,1% roztworze hialuronidazy, w celu rozproszenia komórek ziarnistych. Oocyty płukano w płynie BWB, następnie inkubowano 1 minutę w 0,1% roztworze trypsyny celem usunięcia osłonki przejrzystej (*zona pellucida*). W przypadku oocytów chemicznych usunięcie osłonki przejrzystej jest wystarczające do uzyskania podatności na penetrację ludzkimi plemnikami. Oocyty po kilkukrotnym płukaniu w płynie BWB przenoszono do kropli (200 µl) z zawiesiną skapacytowanych plemników i pozostawiano w komorze hodowlanej (37°C, 5% CO₂ i 95% wilgotność) na okres od 2 do 3,5 godziny, w zależności od tego, czy celem inkubacji był test SPA (ang. sperm penetration assay) czy uwidocznienie chromosomów plemnikowych.

2.2.3 Ocena penetracji plemników (test SPA)

Po 3,5 godzinach inkubacji z plemnikami, oocyty płukano w trzech kroplach (po 200 µl) świeżego płynu BWB, po czym przenoszono 10–15 oocytów w 10 µl BWB na szkiełko podstawowe i lekko rozplaszczano poprzez nałożenie szkiełka nakrywkowego. Natychmiast oceniano preparat pod mikroskopem kontrastowo-fazowym przy powiększeniu 200 lub 400 razy. Za spenetrowane uznawano oocyty, w których widoczne były, co najmniej dwa przedjądra: żeńskie i męskie (rycina 2.). Liczono odsetek spenetrowanych oocytów w minimum 100 oocytach.



Ryc. 2. Przykład spenetrowanego oocytu chomiego w teście SPA (mikroskop kontrastowo-fazowy, pow. 200x).

Fig. 2. Example of penetrated hamster oocyte in SPA assay.

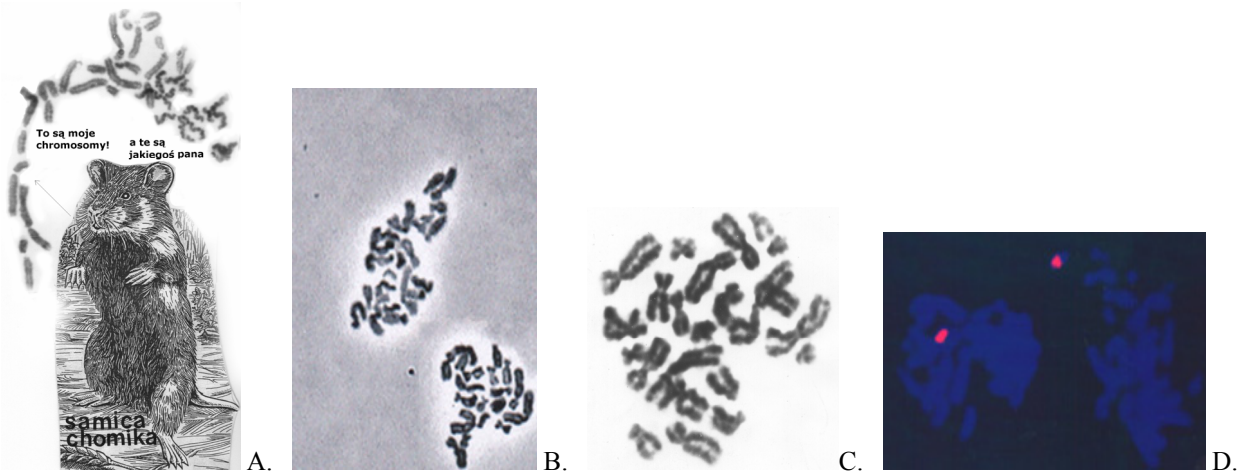
2.2.4. Otrzymywanie preparatów chromosomów plemnika w metafazie

Po upływie od 1,5 do 2 godzin, od początku inkubacji oocytów z plemnikami, penetrację sprawdzano w kilkunastu oocytach: oceniano, czy w minimum połowie komórek można zaobserwować obecność spęczniałych główek plemników (przedjądra męskie widoczne są w większości przypadków najwcześniej po upływie 2,5–3 godzin). Wówczas odpłukiwano oocyty od plemników celem zapobieżenia

nia polispermii, która utrudnia lub wręcz uniemożliwia wykształcenie się chromosomów z męskich przedjądrzy. Następnie przez 6 godzin hodowano oocyty w płynie Ham F-10 (około 20 oocytów/200 μ l) i kolejnych 10 godzin w płynie Ham F-10 z kolcemidem. Kończenie hodowli polegało na przenoszeniu 10 oocytów na 6 minut do płynu hipotonicznego (1% cytrynian sodu), następnie umieszczeniu ich na środku szkiełka podstawowego i nakrapianiu na nie (z wysokości 1 cm) kilku kropli utrwalacza Carnoya. Chromosomy plemnikowe w stadium metafazy uzyskuje się w około połowie spenetrowanych oocytów, tylko część z nich jest odpowiednio rozproszona oraz ma jakość porównywalną z chromosomami otrzymywanymi z limfocytów i tym samym nadaje się na uzyskiwanie wzoru prążkowego GTG [190]. Natomiast do większości preparatów można zastosować fluorescencyjną hybrydyzację *in situ* – FISH (rycina 3.).

niki z szybkim ruchem postępowym, zbierano i plemniki płukano w płynie BWB. Dalej postępowano z frakcją ‘swim-up’ tak samo, jak z plemnikami niefrakcjonowanymi.

Plemniki nanoszono na szkiełka podstawowe i utrwalano w zimnym utrwalaczu Carnoya przez 20 minut. Utrwalacz dwukrotnie zmieniano, po czym preparaty kilkakrotnie płukano buforem 2 x SSC. Preparaty zanurzano w roztworze 25 mM DTT, 0,1 M Tris-HCl (pH 8,5) na okres 5–10 minut. W tych warunkach następowało pęcznienie (1,4 razy) plemników z zachowaniem nienaruszonych witek. Powyższa procedura utrwalania i dekondensacji jest niezbędna do efektywnej hybrydyzacji, jednocześnie pozwala na zachowanie niezmiennego kształtu i topologii wewnątrzjądrowej ludzkiego plemnika [100, 101, 309]. Tak przygotowane preparaty z plemnikami przechowywano w -20°C . W dniu hybrydyzacji preparaty płukano dwukrotnie w buforze 2 x SSC



Ryc. 3. Ilustracja metody uzyskiwania chromosomów ludzkich plemników w stadium metafazy po ksenogenicznej penetracji plemników do oocytów chomiczych. A. Rysunek ideowy ksenogenicznej penetracji plemników. B i C. Płytki metafazowe chromosomów ludzkich plemników (mikroskop kontrastowo-fazowy, powiększenie 400x oraz chromosomy barwione Giemzą, powiększenie 1000x). D. Czerwone sygnały FISH sondy Yqh12 (Texas Red/DAPI, spis sond: patrz tabela 3.).

Fig. 3. Illustration of the method of obtaining human sperm chromosome complements after a xenogenic penetration into hamster oocytes. A. Ideological picture of a xenogenic test of penetration. B&C. Human sperm chromosome complements (phase-contrast microscopy, 400x zoom and chromosome complements after Giemsa staining, 1000x zoom). D. Red FISH signals of probe Yqh12 (Texas Red/DAPI, see the tables of probes in tab. 3).

2.3. Fluorescencyjna hybrydyzacja *in situ* – FISH

2.3.1. Przygotowanie preparatów

Plemniki z upłynnionego w temperaturze pokojowej ejakulatu płukano trzykrotnie w płynie BWB (10 minut przy prędkości 1800 obrotów/minutę). Kilka doświadczeń wykonano na plemnikach frakcjonowanych metodą wypływania, z tzw. frakcji ‘swim-up’. W tym celu ejakulat podwarstwiano pod plyn Ham F10 i inkubowano 1 godzinę w 37°C w atmosferze 5% CO_2 . W trakcie tej inkubacji część ruchliwych plemników aktywnie przemieszczała się do górnej warstwy płynu. Warstwę tę, zawierającą tylko plem-

przez 5 minut w temperaturze pokojowej a następnie odwadniano w szeregu 70%, 85% i 96% etanolu (po 3 minuty). Po wysuszeniu w temperaturze pokojowej preparaty były gotowe do techniki FISH.

W przypadku chromosomów plemnikowych w stadium metafazy (uzyskanych po ksenogenicznej penetracji plemników do oocytów chomiczych), które były przechowywane w zamrażarce w -20°C , postępowano podobnie jak z utrwalonymi plemnikami. Mianowicie: w dniu hybrydyzacji preparaty płukano dwukrotnie w buforze 2x SSC przez 5 minut w temperaturze pokojowej, odwadniano w szeregu 70%, 85% i 96% etanolu (po 3 minuty) i po wysuszeniu w temperaturze pokojowej preparaty były gotowe do techniki FISH.

W przypadku limfocytów, utrwalony materiał biologiczny nakładano na szkiełka podstawowe w dniu hybrydyzacji. Preparaty płukano dwukrotnie w buforze 2 x SSC przez 5 minut w temperaturze pokojowej i odwadniano w szeregu 70%, 85% i 96% etanolu (po 3 minuty). Po wysuszeniu w temperaturze pokojowej preparaty były gotowe do FISH.

2.3.2. Wybór sond do hybrydyzacji

Stosowano sondy Aquarius CYTOCELL (CYTOCELL Tech. Ltd., Cambridge, England) centromerowe, telomerowe i malujące bezpośrednio znakowane jednym z dwóch fluorochromów: FITC (w świetle UV fluorescencja zielona „G = green”) lub Texas Red (fluorescencja czerwona „R = red”) (tabela 3.). W analizach, w których konieczny był FISH trójkolorowy, trzeci kolor fluorescencji (pomarańczowy) uzyskiwano poprzez zmieszanie w stosunku 1:1 takiej samej sondy centromerowej znakowanej FITC oraz Texas Red. FISH-trójkolorowy stosowano do badania wzoru segregacji mejozy w plemnikach nosicieli TCW oraz celem odróżnienia plemników z aneuploidią chromosomów X lub Y od plemników diploidalnych.

usuwalną warstwę uszczelniającą. Denaturację przeprowadzano w temperaturze 75°C przez 2,5 minuty. Hybrydyzację prowadzono przez 20 godzin w 37°C, w ciemnej, wilgotnej komorze. Po tym czasie usuwano szkiełko nakrywkowe i preparaty płukano 2 minuty w 0,4 x SSC o temperaturze 72°C, a następnie 30 sekund w 2 x SSC, 0,05% Tween 20, pH 7,0 w temperaturze pokojowej.

Na lekko wilgotne preparaty nakrapiano 20 µl DAPI (fluorochrom barwiący kontrastowo chromosomy na niebiesko) i nakrywano szkiełkiem nakrywkowym.

2.4. Analiza mikroskopowa

Sygnaly fluorescencyjne (FISH) analizowano w świetle UV mikroskopu fluorescencyjnego Olympus BX41 przy powiększeniu 1000x pod olejkiem imersyjnym (obiektyw Olympus UPlanF1), używając filtra potrójnego FITC/Texas Red/DAPI lub filtrów selektywnych (Texas Red, lub FITC, lub DAPI (rycina 4.).

Sygnaly FISH analizowano tylko w plemnikach z zachowaną witką. Sygnaly FISH określano jako diploidalne tylko wtedy, gdy odległość między nimi była większa od średnicy sygnału. Wydajność hybrydyzacji określano

Tab. 3. Wykaz stosowanych sond bezpośrednio znakowanych Texas Red (R = red, fluorescencja czerwona) lub FITC (G = green, fluorescencja zielona)

Tab. 3. List of the applied probes labeled with Texas Red (R=red FISH signal) or FITC (G = green FISH signal)

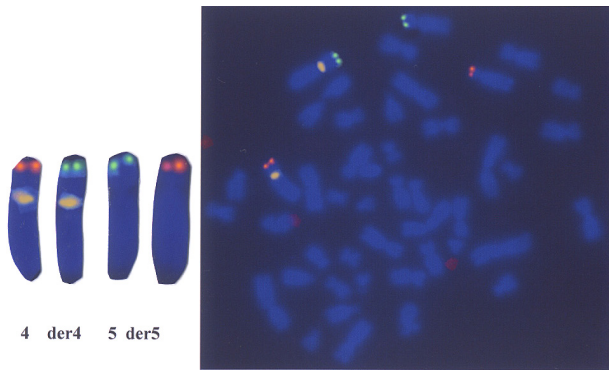
Chromosom	Sonda centromerowa		Sonda subtelerowa		Sonda malująca
	nazwa katalogowa R = red, G = green	region chromosomu	nazwa katalogowa Red = red, G = green	nazwa markera	nazwa katalogowa R = red, G = green
1	-	-	LPT01PG	CEB108/T7	-
2	-	-	LPT02PR	2ptel27	-
4	LPE04R/G	4p11-q11	LPT04PR LPT04QG	4ptel04 4qtel11	LPP04G
5	-	-	LPT05PG	5ptel48	-
7	LPE07R/G	7p11.1-q11.1	LPT07QR/G	G31340	-
8	-	-	LPTPG	8ptel91	LPP08R
9	LPE09R/G	9q12	LPTPR/G	9ptel30	-
13	-	-	LPT13QG	13qtel56	-
14	-	-	LPT04QR	14qtel101	-
15	LPE15G	15p11.1-q11.1	-	-	-
18	LPE18R	18p11.1-q11.1	-	-	-
20	LPE20R	-	-	-	LPP20G
21	-	-	LPT21QR	21qtel07	-
X	LPE0XR/G	Xp11.1-11.1	-	-	-
Y	LPE0YR/G LPE0YqR/G	Yp11.1-q11.1 Yq12	-	-	LPP0YR
XpYp	-	-	LPTXYPG	839D20	-
XqYq	-	-	LPTXYQR	225F6C8.2	-

2.3.3. Warunki denaturacji i hybrydyzacji

Preparaty oraz odpowiednią mieszaninę hybrydyzacyjną (2,5 µl każdej z wybranych dla danej analizy sond + bufor hybrydyzacyjny do końcowej objętości 10 µl) ogrzewano 5 minut w 37°C, nakładano na wybrane miejsce preparatu i przykrywano szkiełkiem nakrywkowym. Brzegi szkiełka nakrywkowego pokrywano gumą arabską, która po kilku minutach zasychała tworząc łatwo

w pierwszych 500 badanych komórkach, w plemnikach wynosiła 95–98% (w plemnikach mężczyzn z grupy kontrolnej wynosiła z reguły 98%). Poziom aneuploidii oceniano licząc sygnały FISH w 5000 jąder komórkowych, wzory segregacji mejozy analizowano w 3500 plemnikach, a wewnątrzjądrową topologię analizowano w 500 plemnikach (dla celów lokalizacji liniowej) lub w 150 (dla lokalizacji radialnej).

Wyniki rejestrowano i kolekcjonowano stosując kamerę (Olympus U-TV1X-2/U-CMAD3) i program komputerowy ISIS MetaSystems (v. 5.0, Altlussheim, Niemcy).



Ryc. 4. Przykład sygnałów trój kolorowego FISH zastosowanego do znakowania chromosomów 4 i 5 u nosiciela translokacji t(4;5)(p15.1;p12). Sygnał pomarańczowy: sonda 4-centromerowa zielona + sonda 4 centromerowa czerwona (1:1); sygnał czerwony: sonda 4ptel; sygnał zielony: sonda 5ptel (spis sond: patrz tabela 3.).

Fig. 4. Example of tricolor FISH signals applied to the labeling of chromosomes 4 and 5 in a carrier of t(4;5)(p15.1;p12). Orange signal: green probe 4c + red probe 4c (1:1); red signal: probe 4ptel; green signal: probe 5 ptel (see the list of probes in tab. 3).

2.5. Ocena seminologiczna

Ejakulat ulegał upłynnieniu w temperaturze pokojowej przez około 30 minut. Analizę seminologiczną wykonywano według wytycznych WHO [423]. Za prawidłowe parametry uznawano: minimum 20 mln plemników na 1 ml ejakulatu, 50% ruchliwych plemników (łącznie z szybkim ruchem postępowym prostolinijnym kategorii A oraz z wolnym ruchem postępowym nieprostolinijnym kategorii B) i 30% plemników z prawidłową morfologią (lub alternatywnie 14%, ze względu na wprowadzenie tzw. ścisłych kryteriów Krügera [310]).

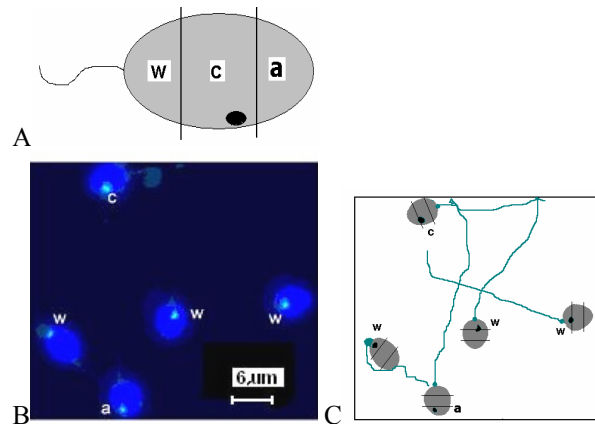
2.6. Graficzna wizualizacja wyników pozycjonowania centromerów

2.6.1. Lokalizacja liniowa

Schematyczny podział jądra komórkowego plemnika na 3 części, z których każda stanowiła około $\frac{1}{3}$ długości jądra przedstawiono na rycinie 5. Części nazwano obszarami: (a) – bliżej akrosomu; (c) – centrum; (w) – bliżej wtyki.

Analiza lokalizacji liniowej polegała na określeniu, w którym z trzech obszarów widoczny był centromer danego chromosomu (sygnał FISH) i policzeniu, w jakim odsetku plemników był to obszar (a), (c) lub (w) [311]. Plemniki, wcześniej sfotografowane, widoczne były na monitorze komputera (program ISIS MetaSystems). Dla każdego badanego chromosomu analizowano

lokalizację sygnałów FISH w 500 plemnikach danego osobnika.



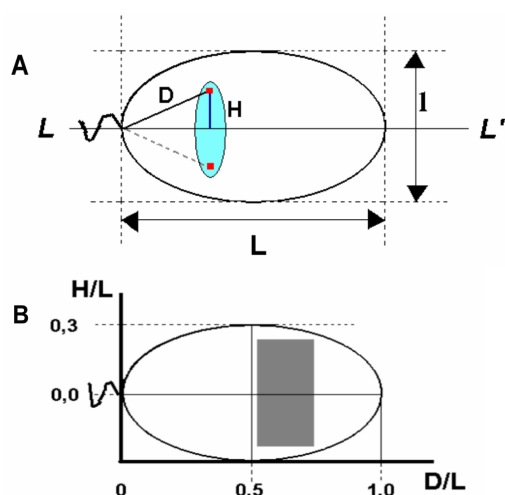
Ryc. 5. Schemat jądra komórkowego plemnika ilustrujący sposób analizy lokalizacji liniowej centromerów wybranych chromosomów. A. Jądro komórkowe plemnika podzielono na trzy obszary, które nazwano: (a) bliżej akrosomu; (c) centrum; (w) bliżej wtyki. Czarny punkt ilustruje przykładową pozycję sygnału FISH sondy centromerowej. B. Przykład sygnałów FISH w plemnikach (sonda centromerowa chromosomu 7, FITC/DAPI, spis sond w tabeli 3). C. Szkic obrazu przedstawionego na rycinie 5B wraz z określeniem pozycji centromeru odpowiednio w obszarze (a) lub (c) lub (w).

Fig. 5. Scheme of sperm nucleus illustrating the analysis of the linear localization of centromeres of selected chromosomes. A. Sperm nucleus is divided into three areas, labeled as follows: (a) = closer to the acrosome, (c) = center, (w) = closer to tail. The black spot indicates a sample position of the FISH signal of the centromeric probe. B. Example of FISH signals in sperm nuclei (the centromeric probe of chromosome 7, FITC/DAPI, see the probe list in tab. 3). C. Schematic view of sperm nuclei shown in fig.5B together with the description of the position of the centromere in areas (a), or (c) or (w).

2.6.2. Lokalizacja radialna

Lokalizacja radialna polegała na określeniu, czy centromer danego chromosomu, widoczny np. w obszarze (a) (wg kryterium lokalizacji liniowej), znajduje się w głębi jądra komórkowego plemnika (tzw. lokalizacja centralna) czy bliżej błony jądrowej (tzw. lokalizacja peryferyjna). Podstawę do takiego „przestrzennego” przedstawienia pozycji centromerów stanowiła metoda zastosowana przez Zalenskaya i Zalensky (2004) do wizualizacji obszaru chromocentrum [92]. Metoda oparta jest na fakcie, iż plemniki na szkiełku podstawowym mogą układać się tylko w określony sposób: wzdłuż osi podłużnej przyjmując jedną z dwóch pozycji „orzel lub reszka”. Schemat jądra komórkowego plemnika, stanowiący podstawę do określania lokalizacji radialnej centromerów przedstawiono na rycinie 6A. Na schemacie tym wartość stosunku D/L określa pozycję centromeru względem długości plemnika. Im wartość D/L bliższa 1,0, tym centromer zlokalizowany jest bliżej obszaru akrosomu. Natomiast wartość stosunku H/L określa „głębokość” położenia centromeru we wnętrzu jądra komórkowego: im wartość H/L bliższa 0,3, tym centromer zlokalizowa-

ny jest bliżej błony jądrowej plemnika (lokalizacja peryferyjna) [92, 311]. Trzeba tu podkreślić, że metoda określania stosunku D/L , czyli odległości centromeru od punktu przyczepu wtki plemnika (D) do długości osi podłużnej (L) oraz stosunku H/L , czyli odległości centromeru od osi poprzecznej (H) do długości osi podłużnej (L) stanowi jednocześnie sposób normalizacji wyników. Normalizacja taka minimalizuje potencjalne różnice między plemnikami w lokalizacji centromerów wynikające z procesu pęcznienia podczas przygotowywania preparatów do FISH [92]. Nanosząc w układzie współrzędnych na oś OX wartości D/L , a na oś OY wartości H/L uzyskuje się wizualne przedstawienie radialnej lokalizacji centromerów w jądrze plemnika w obszarze chromocentrum (rycina 6B) [92]. Plemniki, wcześniej sfotografowane, widoczne były na monitorze komputera (korzystano z programu ISIS MetaSystems, który umożliwia pomiar geometrycznych parametrów komórki). Dla każdego badanego chromosomu analizowano lokalizację centromerów (sygnałów FISH) w 150 plemnikach danego osobnika.



Ryc. 6. Schemat jądra komórkowego plemnika ilustrujący sposób analizy lokalizacji radialnej centromerów wg [92]. Na schemacie przedstawiono geometryczne parametry plemnika: $L-L'$ podłużna oś plemnika; L —długość osi podłużnej; l —długość osi poprzecznej plemnika (stosunek l/L określa kształt jądra plemnika); D —odległość centromeru od punktu przyczepu wtki plemnika; H —odległość od osi podłużnej. A. Jasnoszare tło wyznacza przykładowy potencjalny obszar lokalizacji centromeru (\bullet) danego chromosomu po obydwóch stronach osi podłużnej (lustrzane odbicie) w pojedynczym plemniku. B. Schemat ilustrujący sposób wizualizacji lokalizacji radialnej obszaru chromocentrum (szare tło) wg [92].

Fig. 6. Scheme of the sperm nucleus illustrating the analysis of radial localization of centromeres according to [92]. The scheme includes the geometric parameters of the spermatozoon: $L-L'$ the axis of symmetry; L —the length of the oblong axis; l —the length of the lateral axis (the l/L ratio describes the shape of the nucleus); D —the distance between the centromere and the attachment site of the tail; H —the distance from the oblong axis. A. The light grey background indicates a sample potential area of the locus of centromere (\bullet) of a given chromosome on both sides of the oblong axis (the mirror image) in a singleton spermatozoon. B. The scheme illustrating the visual radial localization of the chromocentromere area (the grey background) according to [92].

2.7. Analiza statystyczna wyników

W celu porównania wyników dotyczących lokalizacji liniowej centromerów chromosomów w obszarach (a), (c) oraz (w) dla badanych grup mężczyzn zastosowano test X^2 (chi-kwadrat) na poziomie istotności $\alpha = 0,05$. Różnice indywidualne sprawdzano testem Fishera na poziomie istotności $\alpha = 0,05$. W celu porównania wyników dotyczących lokalizacji radialnej zastosowano jednokierunkową analizę wariancji (one-way ANOVA) oraz test U Manna-Whitneya na poziomie istotności $\alpha = 0,05$. W celu porównania wyników dotyczących badania częstotliwości aneuploidii w plemnikach i limfocytach krwi obwodowej grupą kontrolną a grupą mężczyzn z niepowodzeniami rozrodu zastosowano test U Manna-Whitneya na poziomie istotności $\alpha = 0,05$. Dla sprawdzenia korelacji między poziomem aneuploidii w limfocytach i plemnikach zastosowano korelację porządku rang Spearmana. W celu porównania wyników dotyczących wzorów segregacji mejozytycznej u nosicieli translokacji zastosowano test X^2 (chi-kwadrat) z korekcją Yatesa na poziomie istotności $\alpha = 0,05$. Analizę statystyczną testami: one-way ANOVA, U-Manna-Whitneya wykonano przy użyciu programów Analyse-it for Microsoft Exel v. 1.68 i Origin 6.1, inne obliczenia statystyczne wykonano w Zakładzie Informatyki i Statystyki Akademii Medycznej w Poznaniu

IV. WYNIKI

1. Wyniki testu penetracji plemników (SPA) i analizy kariotypów somatycznych

1.1. Wyniki testu SPA i analizy kariotypów u mężczyzn z grupy kontrolnej

Grupę kontrolną stanowiło 23 zdrowych mężczyzn w wieku od 23 lat do 40 lat (średnia wieku 27 ± 5 lat) o prawidłowych cechach ejakulatu (wg kryteriów WHO) [312], w większości przypadków o potwierdzonym ojcostwie. Charakterystykę grupy kontrolnej przedstawiono w tabeli 4. We wszystkich przypadkach stwierdzono kariotyp 46,XY (w limfocytach krwi obwodowej). Średni wynik testu penetracji plemników (SPA) w grupie kontrolnej wyniósł $60\% \pm 17\%$; indywidualne wyniki znacznie różniły się między sobą (w zakresie 95%–40%).

Tab. 4. Grupa kontrolna: wiek, kariotyp w limfocytach krwi obwodowej i wynik testu penetracji plemników (SPA)

Tab. 4. Control group: age, the karyotype in the lymphocytes and the result of the penetration assay (SPA)

Lp.	Inicjały	Wiek (lata)	Kariotyp	SPA (%)
1	T.K.	35	46,XY	95
2	A.R.	29	46,XY	95
3	A.A.	25	46,XY	90
4	J.T.	23	46,XY	80
5	S.P.	24	46,XY	73
6	X.R.	23	46,XY	65
7	M.A.	28	46,XY	65
8	K.A.	38	45,XY	63
9	W.O.	29	46,XY	60
10	S.N.	23	46,XY	60
11	X.Z.	24	46,XY	59
12	P.S.	24	46,XY	57
13	X.J.	24	46,XY	56
14	R.O.	27	46,XY	56
15	P.J.	25	46,XY	50
16	S.F.	25	46,XY	50
17	N.B.	27	46,XY	47
18	P.A.	25	46,XY	46
19	P.G.	25	46,XY	43
20	R.M.	25	46,XY	40
21	P.Cz.	23	46,XY	40
22	S.O.	40	46,XY	40
23	X.J.	23	46,XY	40
Średnia ± SD		27 ± 5	46,XY	60 ± 17

1.2. Wyniki testu SPA i analizy kariotypów u mężczyzn z prawidłowymi cechami nasienia (w parach małżeńskich z niepłodnością idiopatyczną)

Grupę pacjentów z prawidłową liczbą, ruchliwością oraz morfologią plemników (wg kryteriów WHO) [312] należących do par małżeńskich z tzw. niepłodnością idiopatyczną (I) stanowiło 74 mężczyzn (tabela 5.). Średnia wieku pacjentów wynosiła 35 ± 5 lat (w zakresie od 27 lat do 47 lat) a ich partnerek 33 ± 4 lata (w zakresie od 24 lat do 44 lat). U 66 par z tej grupy wykonano badanie kariotypu (w limfocytach krwi obwodowej). U 71% pacjentów oraz u 85% ich partnerek stwierdzono odpowiednio kariotypy 46,XY i 46,XX (tabela 5.).

Warianty struktury chromosomów (heteromorfizmy wg terminologii Wyandta i Tonka, 2004) [313] stwierdzono u 9% pacjentów oraz u 8% partnerek. Translokacje chromosomowe wzajemne (TCW) wykryto u 6% pacjentów oraz u 2% partnerek. Obecność chromosomów markerowych (wyłącznie jako niskoprocentowy mozaicyzm) obserwowano u 12% pacjentów oraz u 3% partnerek. Aberracje liczby chromosomów (wyłącznie jako niskoprocentowy mozaicyzm) obserwowano u 3% pacjentów oraz u 3% partnerek. W całej grupie (74 pacjentów) średni wynik testu penetracji (SPA) wynosił $44 \pm 23\%$, indywidualne wyniki znacznie różniły się między sobą (w zakresie od 100 do 10%) (tabela 5.). Natomiast w grupie 66 pacjentów o określonym kariotypie średni wynik SPA wynosił 40 ± 16 (tabela 6.).

Należy zaznaczyć, iż klasyfikacja wyników testu SPA zależy od przyjęcia „punktu odcięcia”, tj. wartości, poniżej której wyniki będą uznawane za obniżone w stosunku do normalnego poziomu penetracji. Najniższa wartość testu SPA w grupie kontrolnej (tabela 4.) wynosiła 40%. Biorąc jednak pod uwagę także dane literaturowe, przyjęto dla dalszych rozważań mniej restrykcyjną klasyfikację wyników zaproponowaną przez Rogers i stosowaną przez większość autorów [314]. Mianowicie, uznano za prawidłowe (tzw. „pozytywne”) wyniki testu SPA większe niż 30%. Wyniki w zakresie: równe lub mniejsze od 30%, ale większe niż 20%, uznano za niejednoznaczne (tzw. „niepewne”), natomiast wyniki równe lub niższe od 20% za jednoznacznie negatywne.

Stosując powyższe kryterium stwierdzono, że u większości (69%) pacjentów (bez względu na kariotyp) uzyskano jednoznacznie pozytywne wyniki testu SPA, natomiast jednoznacznie negatywne tylko u 17% (tabela 6.). Zestawienie wyników testu SPA z wynikami analizy kariotypów w limfocytach krwi obwodowej pozwoliło stwierdzić, że większość (70%) pacjentów z kariotypem 46,XY oraz większość (88%) z chromosomami markerowymi miała pozytywne wyniki testu SPA. U nosicieli translokacji (TCW), a także w przypadkach wariantów (heteromorfizmów) lub aberracji liczby chromosomów pozytywne wyniki testu SPA miało tylko 50% pacjentów (tabela 6.). W tabeli 7. przedstawiono indywidualne wyniki testu SPA u badanych pacjentów ze stwierdzonym heteromorfizmem.

Tab. 5. Mężczyźni z prawidłową liczbą, ruchliwością i morfologią plemników należący do par małżeńskich z niepłodnością idiopatyczną (I): wiek, kariotyp w limfocytach krwi obwodowej, wyniki testu penetracji plemników (SPA) oraz wiek i kariotyp partnerki
 Tab. 5. Men with the normal number, motility, and morphology of spermatozoa in married couples with idiopathic infertility (I): age, the karyotype in the lymphocytes, the result of the penetration assay (SPA) and the of female partner's age and karyotype

Pacjent ♂					Partnerka ♀				
Lp.	Inicjały	Wiek lata	Typ niepl.	Kariotyp w limfocytach	SPA %	Wiek lata	Kariotyp	Informacje z wywiadu	
1	R.M.	30	I	bo	100	24	bo		
2	W.P.	bd	I	46.XY[96]/47.XY+mar[4].fish der(13)(wcp13+)	93	bd	46.XX		
3	M.K.	29	I	46.XY	90	28	46.XX		
4	W.P.	30	I	46.XY	89	26	46.XX	toksoplazmoza	
5	T.K.	40	I	46.XY	87	39	46.XX	przeciwiata w sluzie szyjkowym	
6	K.W.	42	I	46.XY	87	40	46.XX		
7	M.O.	31	I	46.XY	85	30	46.XX		
8	J.K.	27	I	46.XY	82	26	46.XX		
9	J.Z.	36	I	46.XY	80	35	46.XX,9qh+		
10	M.C.	35	I	46.XY	78	27	46.XX		
11	S.D.	35	I	46.XY	77	35	46.XX		
12	A.K.	31	I	46.XY	75	36	46.XX	przeciwiata w sluzie szyjkowym	
13	H.M.	36	I	46.XY	71	34	46.XX	spontaniczne poronienia	
14	L.W.	37	I	46.XY	69	35	46.XX		
15	Z.L.	33	I	46.XY[96]/47.XY+mar[4].fish der(20)(wcp.20+)	61	32	46.XX,9qh+	trzy poronienia	
16	A.R.	38	I	46.XY[98]/47.XY+mar[2].fish der(18)(wcp18+)	60	33	46.XX		
17	P.S.	36	I	46.XY[98]/47.XY+mar[2].fish der(18)(wcp18+)	55	34	46.XX		
18	D.J.	38	I	46.XY	55	36	46.XX		
19	A.L.	30	I	46.XY,1qh+	55	30	46.XX		
20	J.S.	41	I	46.XY	55	35	46.XX	pierwsza ciaza obumarla (niepl. wtorna?)	
21	M.Z.	35	I	46.XY	55	25	46.XX		
22	J.M.	35	I	46.XY	50	32	46.XX		
23	R.W.	37	I	46.XY	50	32	46.XX		
24	Z.C.	42	I	46.XY,inv(9)(p11q12)	50	41	46.XX		
25	M.C.	47	I	46.XY	50	44	46.XX		
26	M.B.	bd	I	46.XY[95]/47.XY+mar[5]	50	bd	46.XX		
27	K.L.	37	I	46.XY	46	34	45,X[2]/46,XX[98]		
28	W.G.	33	I	46.XY	44	30	46.XX		
29	J.O.	38	I	46.XY	43	37	46.XX	zaburzenia w owulacji	
30	X.L.	35	I	46.XY	42	33	46.XX	przeciwiata w sluzie szyjkowym	
31	P.O.	40	I	46.XY,t(1;4)(q23;q27)	42	35	46.XX		
32	W.G.	35	I	46.XY	42	33	46.XX		
33	W.W.	36	I	45.XY,t(13;14)(q10;q10)	40	36	46.XX	poronienie	
34	J.A.	34	I	bo	40	34	bo		
35	R.F.	34	I	46.XY,17cen dh+	40	33	45,XX,der(13;14)(q10;q10)		
36	T.K.	36	I/IM	46.XY	39	36	46.XX		
37	X.R.	33	I	46.XY[98]/47.XY+mar[2].fish der(16)(wcp16+)	38	35	46.XX		

38	T.Z.	30	I	bo	38	30	bo	endometrioza
39	J.M.	bd	I	46.XY[92]/47.XXY[4]/47.XY.+mar[4]	38	bd	46.XX	przeciwiata przeciwlpl. w surowicy
40	E.J.	44	I	46.XY	36	39	46.XX	
41	R.A.	39	I	46.XY	36	34	46.XX	
42	M.W.	38	I	bo	36	35	bo	
43	J.K.	34	I	46.XY	36	bd	46.XX	
44	P.M.	38	I	46.XY	35	37	46.XX[97]/45.X[3]	
45	P.Z.	35	I	bo	34	34	bo	
46	S.S.	40	I	46.XY	34	36	46.XX	
47	A.T.	28	I	bo	34	28	bo	
48	M.D.	29	I	46.XY	34	26	46.XX	
49	J.K.	37	I	46.XY	33	32	46.XX	
50	J.K.	36	I	46.XY	33	31	46.XX	
51	M.S.	37	I	46.XY	33	34	46.XX	
52	T.N.	bd	I	46.XY	33	bd	46.XX	
53	M.K.	33	I	bd	31	30	bd	poronienie w 2 miesiacu
54	A.B.	36	I	46.XY.9qh+	30	30	46.XX	przeciwiata w sluzie szyjkowym
55	P.B.	29	I	46.XY[96]/47.XY.+mar[4].13ps+	30	29	46.XX	
56	K.K.	38	I	46.XY	30	31	46.XX.1qh+	poronienie w 2 miesiacu
57	X.B.	31	I	46.XY	28	30	46.XX	
58	T.H.	45	I	46.XY	27	37	46.XX[98]/47.XX.+mar[2].fish der(22)	
59	T.M.	35	I	46.XY	26	35	46.XX	przeciwiata przeciwlpl. w surowicy
60	X.P.	30	I	46.XY	25	28	46.XX	
61	M.B.	37	I	46.XY[97]/47.XY.+2[3]	25	36	46.XX	
62	G.B.	bd	I	46.XY	25	bd	46.XX	
63	X.S.	36	I	46.XY	20	33	46.XX	
64	S.D.	bd	I	46.XY	20	bd	46.XX	
65	W.C.	bd	I	46.XY	20	bd	46.XX	przeciwiata w sluzie szyjkowym
66	M.Z.	41	I	46.XY	20	39	46.XX	
67	A.S.	32	I	46.XY	20	33	46.XX	
68	T.Z.	29	I	46.XY	20	26	46.XX.9qh+.2[ps+	przeciwiata w sluzie szyjkowym
69	D.T.	28	I	46.XY.t(6;10)(p11.2;p12)	20	28	46.XX	
70	A.O.	45	I	45.XY.t(10;11)(q11.2;p15.1)	15	40	46.XX	
71	K.J.	28	I	46.XY	15	29	46.XX.iny(9)(p11q12)	
72	J.P.	bd	I	46.XY del(Y)(q12)	15	bd	46.XX[92]/47.XX.+mar[8]	przeciwiata w sluzie szyjkowym
73	R.D.	43	I	46.XY	15	44	46.XX	przeciwiata w sluzie szyjkowym
74	X.W.	35	I	bo	10	35	bo	przeciwiata w sluzie szyjkowym
Średnia ±SD		35 ±5			44 ±23	33 ±4		

bo = brak oznaczeni; bd = brak danych; SPA = test penetracji ludzkich plemnikow do oocytow chomiczych; I = niepłodność idiopatyczna (prawidłowa liczba, ruchliwość i morfologia plemników); IM = obecność przeciwiata przeciwplemnikowych (w tym przypadku poniżej 20%).

Tab. 6. Mężczyźni z prawidłową liczbą, ruchliwością i morfologią plemników (niepłodność idiopatyczna I): kariotyp w limfocytach krwi obwodowej a wyniki penetracji plemników w teście SPA

Tab.6. Men with the normal number, mobility, and morphology of spermatozoa (idiopathic infertility I): the karyotype in the lymphocytes and the results of the SPA

Kariotyp	Średnia wartość SPA (%)	Wyniki indywidualne SPA		
		Pozytywny > 30%	Niepewny 20 < SPA ≤ 30	Negatywny ≤ 20%
46,XY n = 47 (71%)	45 ± 23	n = 33 (70%)	n = 6 (13%)	n = 8 (17%)
heteromorfizmy n = 6* (9%)	37 ± 15	n = 3 (50%)	n = 2 (33%)	n = 1 (17%)
translokacje n = 4 (6%)	29 ± 14	n = 2 (50%)	n = 0 (0%)	n = 2 (50%)
chromosomy markerowe (mozai.) n = 8*(12%)	53 ± 20	n = 7 (88%)	n = 1 (12%)	n = 0 (0%)
aberracje liczby chromosomów (mozai.) n = 2**(3%)	34 ± 6	n = 1 (50%)	n = 1 (50%)	n = 0 (0%)
łącznie n=66	40 ± 16	(69%)	(15%)	(17%)
grupa kontrolna 46,XY n = 23	60 ± 17	100%	0%	0%

N = liczba mężczyzn; * u P.B. (nr 55, tabela 5.) stwierdzono obecność chromosomu markerowego oraz wariantu 13ps+;

** u J.M. (Nr 39, tabela 5.) stwierdzono obecność dodatkowego chromosomu X (4%) oraz chromosomu markerowego (4%)

(mozai.) = mozaicyzm komórkowy

Tab. 7. Wyniki penetracji plemników w teście SPA u mężczyzn z niepłodnością idiopatyczną I, u których stwierdzono heteromorfizmy

Tab. 7. Results of SPA in men with idiopathic infertility I, who were diagnosed with the variants of chromosome structure

Typ niepł.	Kariotyp w limfocytach	SPA (%)
I	46,XY,1qh+	55
I	46,XY,inv(9)(p11q12)	50
I	46,XY,9qh+	30
I	46,XY,17cen qh+	40
I	46,XY[96]/47,XY,+mar[4], 13ps+	30
I	46,XY,del(Y)(q12)	15

1.3. Wyniki testu SPA i analizy kariotypów u mężczyzn z zaburzeniami spermatogenezy

Grupę pacjentów z zaburzeniami spermatogenezy różnego typu (O, A, T oraz AZ) stanowiło 110 mężczyzn (tabela 8.). Średnia wieku pacjentów wynosiła 34 ± 5 lat (w zakresie od 25 do 48 lat) a u ich partnerek 32 ± 4 lata (w zakresie od 24 do 46 lat). U 80 pacjentów z O;A;T oraz u 20 pacjentów z AZ wykonano badanie kariotypu w limfocytach krwi obwodowej. U 77% pacjentów z O;A;T oraz u 89% partnerek stwierdzono odpowiednio kariotypy 46,XY i 46,XX (tabela 8.). Warianty (heteromorfizmy) chromosomów stwierdzono u 21% pacjentów oraz u 10% partnerek. Translokacje lub inwersje wykryto u 2% pacjentów. U 65% pacjentów z azoospermią oraz u 90% partnerek stwierdzono odpowiednio kariotypy 46,XY oraz 46,XX (z zastrzeżeniem, że badanie wykonano tylko dla 10 kobiet) (tabela 8.). Warianty (heteromorfizmy) chromosomów stwierdzono u 15% pacjentów z azoospermią oraz u jednej partnerki. Ponadto wykryto translokacje (10%), chromosom markerowy (5%) i zespół Klinefeltera (5%) (tabela 8.).

Dla 90 pacjentów (tabela 8.) wykonano test SPA. Azoospermia uniemożliwiła wykonanie testu SPA u 20-stu

pacjentów. W tej grupie średni wynik testu SPA wynosił 33 ± 20% (w zakresie od 86% do 0%). Jednocześnie pozytywne wyniki testu SPA stwierdzono tylko u 46% pacjentów (bez uwzględniania wyniku kariotypowania). W tabeli 9. przedstawiono średnie wartości testu SPA w grupach pacjentów o określonym typie niepłodności. Najniższą średnią wartość testu SPA (tylko 21%) miała grupa z oligoasthenoteratozoospermią (OAT). Natomiast najwyższą wartość średnią (58% – co jest wartością znamiennej wyższą w porównaniu ze średnią dla wszystkich pacjentów – 33%) miała grupa z oligoasthenozoospermią (OA). Była to jednak najmniej liczna grupa, zatem nie można wykluczyć, że ta średnia w przypadku liczniejszej grupy byłaby zbliżona do innych.

Grupę mężczyzn z O;A;T, dla której wykonano zarówno test penetracji plemników SPA, jak i badanie kariotypu stanowiło 80 osób (tabela 10.). Przedstawione w tabeli 10 zestawienie wyników testu SPA oraz kariotypowania pozwoliło stwierdzić, że spośród 59 pacjentów z kariotypem 46,XY pozytywne wyniki testu SPA miała blisko połowa badanych (49%), natomiast negatywne miało 31%. W porównaniu z tą grupą, u osób z wariantami struktury chromosomów stwierdzono znacznie niższy odsetek (37%) pozytywnych wyników testu SPA, natomiast odsetek wyników negatywnych był zbliżony (26%). W tabeli 11. przedstawiono indywidualne wyniki testu SPA w określonych przypadkach wariantów struktury chromosomów (heteromorfizmów). U pacjentów z O;A;T wykryto zarówno warianty chromosomów będące inwersjami pericentrycznymi (chromosomy 9, 19, 22), jak i wydłużonymi blokami heterochromatyny (chromosomy 9, 16) oraz warianty długości ramion krótkich chromosomów akrocentrycznych. Takie same warianty wykrywano u pacjentów z różnym typem niepłodności i o różnych wartościach testu SPA. Jednocześnie liczba wykrytych przypadków z wariantami chromosomów w poszczególnych podgrupach była zbyt mała, aby obliczać wartości średnie.

Tab. 8. Mężczyźni z zaburzeniami spermatogenezy (O, A, T oraz AZ): wiek, wartości ejakulatu, kariotyp w limfocytach krwi obwodowej, wyniki testu penetracji plemników (SPA) oraz wiek i kariotyp partnerki

Tab. 8. Men with spermatogenesis dysfunctions (O,A,T and AZ): age, sperm parameters, karyotype in the lymphocytes of the peripheral blood, results of SPA and the female partner's age and the karyotype

Lp.	Inicjały	Wiek (lata)	Wartości ejakulatu				Typ niepł.	Kariotyp	SPA %	Partnerka ♀		
			Liczba mln/ml	Ruch. %	Morfol. % prawidł.	Wiek (lata)				Kariotyp	Informacje z wywiadu	
												Wiek (lata)
1	S.K.	bd	3	50	20*	O	46,XY,19cen h-q	56	bd	46,XX		
2	A.R.	30	16	55	14*	O	46,XY	40	35	46,XX		
3	J.B.	37	0,1	50	30	O	46,XY,9qh+	30	33	46,XX		
4	J.G.	48	7,3	62	14*	O/IM	bo	30	40	bo	dziecko z poprzedniego związku	
5	G.P.	37	8	59	30	O	46,XY	21	37	46,XX		
6	J.K.	27	120	40	17	A	46,XY	82	26	46,XX		
7	R.W.	39	42	33	24*	A	46,XY	81	30	46,XX		
8	M.P.	35	57	20	15*	A	bo	60	35	bo		
9	M.S.	33	30	30	15*	A	bo	50	32	bo		
10	M.K.	33	30	40	14*	A	46,XY	50	32	46,XX		
11	P.K.	40	88	45	19*	A	46,XY	47	37	46,XX		
12	X.K.	33	25	42	30	A	46,XY	41	27	46,XX		
13	P.F.	34	59	27	68	A	46,XY,inv(9)(p11q12)	40	31	46,XX		
14	G.G.	34	30	35	24*	A	46,XY	35	30	46,XX		
15	J.L.	37	47	3	15	A	46,XY	35	33	46,XX		
16	J.Z.	34	144	21	15*	A	bo	33	35	bo		
17	S.T.	37	20	30	15*	A	46,XY	32	37	46,XX,21psstk+		
18	S.T.	38	20	30	15*	A	46,XY	30	38	46,XX,21psstk+		
19	C.B.	46	50	34	14*	A/IM	bo	30	40	bo	dziecko z poprzedniego związku	
20	M.H.	30	25	34	21*	A	46,XY	30	30	46,XX		
21	K.W.	30	30	30	15*	A	bo	29	29	bo		
22	X.M.	39	26	40	14*	A	bo	26	34	bo		
23	W.D.	32	20	25	31	A/IM	46,XY,14ps+,15ps+	26	31	46,XX,14ps+,21ps+		
24	P.B.	35	83	35	30	A	46,XY	25	34	46,XX		
25	M.B.	40	30	34	36	A	46,XY	12	37	46,XX		
26	M.N.	47	21	27	40	A	46,XY	9	46	46,XX		
27	P.G.	39	84	58	13*	T	46,XY	69	31	46,XX,19cen h-q		
28	A.H.	42	192	53	22	T	46,XY	60	29	46,XX		
29	M.G.	33	89	75	13	T	46,XY	44	26	46,XX		
30	X.J.	25	25	50	20	T	46,XY	40	25	46,XX,9qh+		
31	D.N.	33	24	36	9	T	46,XY,19cen h-q	34	31	46,XX	cysty na jajnikach i jajowodach	
32	P.S.	38	20	44	7*	T	46,XY,19cen h-q	30	35	46,XX		
33	T.K.	31	32	54	17	T	46,XY	26	30	46,XX		

cd. tab. 8

34	R.O.	34	38	45	7*	T	46.XY		20	31	46.XX.
35	K.O.	31	78	57	1*	T	46.XY.19cen h-q		0	31	46.XX
36	M.L.	37	2	40	44	OA	46.XY.inv(22)(p13p11)		70	35	46.XX
37	M.G.	28	11	30	40	OA	46.XY.9qht+		67	28	46.XX
38	P.P.	33	9	36	30	OA/IM	46.XY		60	32	46.XX
39	P.J.	32	10	23	46	OA	46.XY		37	31	46.XX
40	M.W.	32	20	34	10	OT	46.XY		75	29	46.XX
41	Z.P.	32	18	60	20	OT	46.XY		50	32	46.XX
42	M.W.	31	10	70	14	OT	46.XY		42	31	46.XX
43	R.K.	31	11	54	7	OT	46.XY		40	29	46.XX
44	M.P.	40	21	50	9	OT	46.XY.inv(9)(p11q12)		6	36	46.XX
45	M.J.	bd	12	54	20	OT	46.XY.22ps+		5	bd	46.XX
46	Z.D.	45	61	16	8*	AT	46.XY		86	36	46.XX
47	N.K.	36	75	39	23	AT	46.XY		80	34	46.XX
48	A.K.	37	85	47	20	AT/IM	46.XY		57	35	46.XX
49	K.N.	36	80	40	7*	AT	46.XY		44	36	46.XX
50	D.R.	bd	77	35	21	AT	46.XY		38	bd	46.XX
51	X.T.	33	25	20	5*	AT	46.XY		38	33	46.XX
52	P.S.	36	40	36	4	AT	46.XY		35	33	46.XX.inv(19)(p13;q13)
53	M.R.	31	29	43	4*	AT	46.XY.14p s+		37	26	46.XX
54	J.S.	40	27	20	12*	AT	46.XY		34	40	46.XX
55	J.F.	34	65	32	10	AT	46.XY.13ps+.14ps+.22ps+		33	32	46.XX
56	R.K.	32	20	40	8*	AT	45.XY.(13;14)(q10;q10)		32	29	46.XX
57	X.R.	32	75	39	14	AT	46.XY.inv(9)(p11q12)		30	30	46.XX
58	W.G.	39	42	33	5*	AT	46.XY		30	39	46.XX
59	T.T.	bd	100	30	1*	AT	46.XY.22ps+		22	bd	46.XX
60	M.F.	bd	46	12	7*	AT	46.XY		19	bd	46.XX
61	A.M.	34	21	24	17	AT	46.XY		20	30	46.XX
62	X.J.	30	90	38	13*	AT	46.XY		16	26	46.XX
63	J.C.	37	33	23	20	AT	46.XY		15	36	46.XX
64	X.P.	41	26	8	3*	AT	46.XY		11	39	46.XX
65	A.W.	29	26	40	13*	AT	46.XY		10	27	46.XX
66	P.Z.	bd	62	42	18	AT	46.XY		9	bd	46.XX
67	P.K.	34	20	25	10	AT	46.XY		9	33	46.XX
68	X.T.	32	26	17	9*	AT	46.XY		8	34	46.XX
69	M.G.	29	43	20	9	AT	46.XY		0	28	46.XX.16qht+
70	T.K.	bd	5	15	14	OAT	46.XY		44	bd	46.XX
71	M.S.	44	11	35	10*	OAT	46.XY		40	39	46.XX
72	P.R.	32	8	40	7	OAT	bo		35	27	bo
73	X.B.	bd	2	25	6*	OAT	46.XY		32	bd	46.XX
74	X.C.	bd	10	12	3*	OAT	46.XY.9qht+		30	bd	46.XX
75	R.K.	33	16	30	8*	OAT	bo		28	31	bo
76	J.K.	28	6.3	25	6*	OAT	46.XY		26	27	46.XX
77	S.K.	35	3	17	8*	OAT	46.XY.16qht+		25	36	46.XX.21psht+
78	W.C.	25	3	28	6*	OAT	46.XY		25	21	46.XX
79	D.W.	32	3	8	6*	OAT	46.XY		24	32	46.XX

przeciwiała w służbie sztykowym

skręcony lajowód

nieprawidłowości w owulacji

80	X.S.	28	16	12	6*	OAT	46.XY		25	28	46.XX	
81	A.J.	48	9	25	18	OAT	46.XY		22	37	46.XX	
82	Z.S.	35	7.4	24	13*	OAT	46.XY,inv(17)(q21q24)		20	33	46.XX	
83	R.M.	36	14	3	11*	OAT	bo		20	30	bo	5-letnie dziecko (niepl. wtórna?)
84	X.W.	32	16	47	7	OAT	46.XY		17	26	46.XX	
85	P.G.	29	11	32	21	OAT	46.XY		11	28	46.XX	
86	P.B.	40	5	4	3	OAT	46.XY,21psk+		10	33	46.XX	
87	M.B.	29	7	0	3	OAT	46.XY		10	28	46.XX	
88	X.M.	32	1.4	7	3	OAT	46.XY		5	31	46.XX	
89	D.H.	32	1.2	40	7	OAT	46.XY,inv(9)(p11q13),16qh+		5	29	46.XX,21ps+	
90	R.H.	30	0.1	5	10	OAT	46.XY		0	27	46.XX	
91	J.K.	34	0.3	bo	bo	SAZ	46.XY		bo	29	46.XX	
92	S.L.	32	0	bo	bo	AZ	46.XY(49)(47.XY,+der(1q)[1]		bo	31	46.XX	
93	J.O.	30	0	bo	bo	AZ	45.XY,t(13,14)(q10;q10)		bo	30	46.XX	
94	J.S.	38	0	bo	bo	AZ	46.XY,t(4;21)(q11;p11)		bo	37	46.XX	
95	R.R.	34	0	bo	bo	AZ	46.XY,19cen t-q		bo	32	46.XX	
96	J.G.	31	0	bo	bo	AZ	46.XY,9qh+		bo	26	46.XX	
97	J.J.	28	0	bo	bo	AZ	46.XY		bo	24	46.XX	
98	J.U.	28	0	bo	bo	AZ	46.XY		bo	27	46.XX	
99	A.K.	27	0	bo	bo	AZ	46.XY,9qh+		bo	25	46.XX,9qh+,16qh+	
100	R.R.	30	0	bo	bo	AZ	46.XY		bo	30	46.XX	
101	W.S.	33	0	bo	bo	AZ	46.XY		bo	bd	bd	
102	J.J.	30	0	bo	bo	AZ	46.XY		bo	bd	bd	
103	S.T.	30	0	bo	bo	AZ	46.XY		bo	bd	bd	
104	A.P.	29	0	bo	bo	AZ	46.XY		bo	bd	bd	
105	A.O.	32	0	bo	bo	AZ	46.XY		bo	bd	bd	
106	P.S.	28	0	bo	bo	AZ	46.XY		bo	bd	bd	
107	J.N.	29	0	bo	bo	AZ	46.XY		bo	bd	bd	
108	M.G.	25	0	bo	bo	AZ	46.XY		bo	bd	bd	
109	P.W.	32	0	bo	bo	AZ	46.XY		bo	bd	bd	
110	P.B.	30	0	bo	bo	AZ	47,XXY		bo	bd	bd	
Srednia ±SD		34 ± 5							33 ± 20 (bez AZ)	32 ± 4		

bo = brak oznaczeń; bd = brak danych; *wg kryteriów Krügera; SPA = test penetracji ludzkich plemników do oocytów chomiczych; O = oligozoospermia; A = asthenozoospermia; T = teratozoospermia; AZ = azoospermia; SAZ = subazoospermia; AT/IM = obecność przeciwciał przeciwplemnikowych poniżej 20% współwystępująca z asthenoteratozoospermia; O A/IM = obecność przeciwciał przeciwplemnikowych poniżej 20% współwystępująca z oligoasthenozoospermia; O/IM = obecność przeciwciał przeciwplemnikowych poniżej 20% współwystępująca z oligozoospermia; A/IM = obecność przeciwciał przeciwplemnikowych poniżej 20% współwystępująca z asthenozoospermia.

Jedyny wykryty w grupie O;A;T nosiciel translokacji miał pozytywny wynik testu SPA, natomiast nosiciel inwersji miał wynik negatywny (tabela 10.).

Tab. 9. Średnie wartości testu SPA w grupach pacjentów o określonym typie niepłodności (O;A;T)
Tab. 9. Average values of the SPA in groups of patients with a specified type of infertility (O;A;T)

Procent badanych	Typ niepłodności	Średni wynik SPA (%)
5,6%	O	35 ± 13
23,3%	A	38 ± 19
10,0%	T	35 ± 20
4,4%	OA	58 ± 15
6,7%	OT	36 ± 27
26,7%	AT	29 ± 21
23,3%	OAT	21 ± 12
Średnia dla 90 pacjentów z O;A;T		33 ± 20

Tab. 10. Mężczyźni* z zaburzeniami spermatogenezy (O;A;T): kariotyp w limfocytach krwi obwodowej a wyniki testu SPA
Tab. 10. Men with spermatogenesis dysfunction (O;A;T): karyotype in the lymphocytes of the peripheral blood and the results of SPA

Kariotyp grupa (O;A;T)	Średnia wartość SPA (%)	Wyniki SPA (%)		
		Pozytywny > 30%	Niepewny 20 < SPA ≤ 30	Negatywny ≤ 20%
46,xy n = 59 (74%)	34 ± 21	n = 29 (49%)	n = 12 (20%)	n = 18 (31%)
heteromorfizmy n = 19 (24%)	28 ± 18	n = 7 (37%)	n = 7 (37%)	n = 5 (26%)
translokacje, inwersje n = 2 (3%)	26 ± 6	n = 1 (50%)	n = 0 (0%)	n = 1 (50%)
łącznie n = 80*	30 ± 15	n = 37 (46%)	n = 19 (24%)	n = 24 (30%)
grupa kontrolna 46,xy n = 23	60 ± 17	100%	0%	0%

*zestawienie dotyczy tylko 80 pacjentów, dla których wykonano zarówno test SPA jak i badanie kariotypu; n = liczba mężczyzn

Tab. 11. Wyniki testu SPA w przypadkach mężczyzn z zaburzeniami spermatogenezy (O;A;T), u których stwierdzono hetero-morfizmy (warianty chromosomów)
Tab. 11. Results of SPA assay in the cases of men from O;A;T grup, with the variants of chromosome structure

Typ niepl.	Kariotyp	SPA (%)
A	46,XY,inv(9)(p11q12)	40
AT	46,XY,inv(9)(p11q12)	30
OT	46,XY,inv(9)(p11q12)	6
OAT	46,XY,inv(9)(p11q12),16qh+	5
OA	46,XY,9qh+	67
O	46,XY,9qh+	30
OAT	46,XY,9qh+	30
AT	46,XY,14ps+	37
AT	46,XY,13ps+,14ps+,22ps+	33
A/IM	46,XY,14ps+,15ps+	26
OAT	46,XY,16qh+	25
O	46,XY,19cen h-q	56
T	46,XY,19cen h-q	34
T	46,XY,19cen h-q	30
T	46,XY,19cen h-q	0
OAT	46,XY,21psk+	10
OA	46,XY,inv(22)(p13p11)	70
AT	46,XY,22ps+	22
OT	46,XY,22ps+	5

1.4. Wyniki testu SPA a wyniki zapłodnień techniką *in vitro*

Od 34 par małżeńskich z niepłodnością idiopatyczną lub zaburzeniami spermatogenezy, dla których wykonywano test SPA, uzyskano następnie informacje o wynikach zapłodnienia techniką *in vitro* (IVF). Informacje te dotyczyły okresu około dwóch lat po wykonanych testach SPA, zatem nie można wykluczyć, że przynajmniej niektóre z par podjęły kolejne próby uwieńczone sukcesem rodzinnym. W tabeli 12. przedstawiono zestawienie wyników testu SPA z informacją, czy w wyniku zapłodnienia *in vitro* (IVF) dochodziło do łączenia gamet i powstawania zarodków (w kilku przypadkach, po niepowodzeniu IVF, podjęto decyzję o wykonaniu ICSI). W 62% przypadków z pozytywnym wynikiem testu SPA (> 30%) i w 50% przypadków z niepewnym wynikiem testu SPA (20 < SPA ≤ 30) plemniki pacjentów penetrowały ludzkie komórki jajowe i powstawały zarodki. Negatyw-

ny wynik testu SPA (≤ 20%) oznaczał w 99% przypadków brak zarodków. Klasyfikację wyników testu SPA na pozytywne, niepewne i negatywne stosowano zgodnie z objaśnieniem w rozdziale IV.1.2.

2. Wyniki analizy chromosomów plemników

2.1. Analiza występowania aneuploidii w limfocytach i plemnikach

Grupę mężczyzn, u których badano poziom hiperhaploidii chromosomów 13, 15, 18, 21, X i Y (oraz poliploidii) (metoda FISH, spis sond w tabeli 3.) stanowiło 7 mężczyzn z grupy kontrolnej oraz 16 z niepowodzeniami rozrodu (w tym 9 z azoospermią). Charakterystykę grupy z niepowodzeniami rozrodu przedstawiono w tabeli 13. Przykłady sygnałów FISH w plemnikach przedstawiono na rycinie 7. W przypadku pacjentów z azoospermią badania wykonano jedynie na limfocytach krwi obwodowej. Indywidualne wyniki oraz wartości średnie dotyczące częstości aneuploidii badanych chromosomów przedstawiono w tabeli 14.

Tab. 12. Zestawienie wyników testu SPA i typu niepłodności z wynikami zapłodnienia *in vitro*Tab. 12. Compilation of the results of the SPA assay and the infertility type with the results of the *in vitro* fertilization

Lp.	Inicjały	Kariotyp		Typ niepłod.	SPA %	Łączenie gamet <i>in vitro</i> (IVF)	Wynik końcowy
		Pacjent	Partnerka				
1	Z.D.	46,XY	46,XX	AT	86	+	ciąża pozamaciczna
2	J.K.	bo	bo	A	82	+	dziecko
3	A.K.	46,XY	46,XX	I	75	+	poronienie w 2 mies.
4	H.M.	46,XY	46,XX	I	71	+	poronienia
5	M.G.	46,XY,9qh+	46,XX,9qh+	OA	67	+	zarodki nie implantowały
6	S.K.	46,XY,19cen h-q	46,XX	O	56	-	-
7	J.S.	46,XY	46,XX	I	55	+	poronienie w 3 mies.
8	M.S.	bo	bo	A	50	-	-
9	T.K.	46,XY	46,XX	OAT	44	+	dziecko
10	P.O.	46,XY,t(1;4)(q23;q27)	46,XX	I	42	-	zarodki po ICSI, nie implantow.
11	X.K.	46,XY	46,XX	A	41	-	-
12	M.R.	46,XY,14s+	46,XX	AT	37	+	poronienie w 2 mies.
13	M.W.	bo	bo	I	36	+	2 zarodki, nie implantowały
14	J.L.	46,XY	46,XX	A	35	-	-
15	P.Z.	bo	bo	I	34	+	2 zarodki, nie implantowały
16	J.S.	46,XY	46,XX	AT	34	+	2 zarodki, nie implantowały
17	M.D.	46,XY	46,XX	I	34	-	5 zarodków po ICSI, obumarły
18	S.S.	46,XY	46,XX	I	34	-	1 zarodek po ICSI, nie implant.
19	J.Ż.	bo	bo	A	33	+	1 zarodek, obumarł
20	J.K.	46,XY	46,XX	I	33	+	1 zarodek, nie implantował
21	J.F.	46XY,13s+,14s+,22s+	46,XX	AT	33	-	-
22	K.K.	46,XY,9qh+	46,XX,1qh+	I	30	+	poronienie w 2 mies.
23	W.G.	46,XY	46,XX	AT	30	+	1 zarodek, obumarł
24	P.S.	46,XY,19cen h-q,13p-	46,XX	T	30	-	-
25	X.B.	46,XY	46,XX	I	28	-	-
26	W.D.	46,XY,14p+,15p+	46,XX,14ps+,21s+	A/IM	26	-	-
27	X.P.	46,XY	46,XX	I	25	+	poronienie w 2 mies.
28	X.S.	46,XY	46,XX	I	20	+	1 zarodek, nie implantował
29	Z.S.	46,XY,inv(17)(q21;q24)	46,XX	OAT	20	-	-
30	A.O.	45,XY,t(10;11)(9q11.2;p15.1)	46,XX	I	15	-	zarodki po ICSI, nie dzieliły się
31	X.P.	46,XY	46,XX	AT	11	-	-
32	X.T.	46,XY	46,XX	AT	8	-	-
33	A.W.	bo	bo	A	5	-	2 zarodki po ICSI, nie implantow.
34	X.M.	46,XY	46,XX	OAT	5	-	-

bo = brak oznaczeń; O = oligozoospermia; A = asthenozoospermia; T = teratozoospermia; A/IM= obecność przeciwciał przeciwplemnikowych poniżej 20% współwystępująca z azoospermia; ICSI = zapłodnienie drogą docytoplazmatycznego wstrzyknięcia plemnika (intracytoplasmic sperm injection)

Tab. 13. Charakterystyka mężczyzn, u których wykonano badania poziomu aneuploidii chromosomów 13, 15, 18, 21, X oraz Y metodą FISH w plemnikach i/lub jądrach interfazowych limfocytów

Tab. 13. Characteristics of men who were tested for the aneuploidy level of chromosomes 13, 15, 18, 21, X and Y in the sperm cells and/or the nuclei of lymphocytes using the FISH method

Lp.	Inicjały	Wiek (lata)	Kariotyp w limfocytach	Typ niepowodzenia rozrodu
1	A.A.	37	46,XY	OA
2	L.W.	37	46,XY	I
3	M.G.	29	46,XY,9qh+	OA, <i>in vitro</i> – zarodki, bez implantacji
4	G.H.	40	46,XY	P, DP: 47,XX,+21, druga ciąża DP: 47,XY,+13
5	K.K.	35	46,XY,t(4;5)(p15.1;p12)	P, 3 poronienia, zdrowa córka
6	S.K.	65	46,XY,t(4;5)(p15.1;p12)	P, 3 poronienia, syn i córka nosiciele t(4;5)
7	W.W.	36	45,XY,der(13;14)(q10;q10)	I, 1 poronienie
8	W.S.	33	46,XY	A, zahamowanie spermatogenezy na poziomie spermatocytów II rzędu
9	S.T.	30	46,XY	A, zahamowanie spermatogenezy na poziomie spermatocytów II rzędu
10	J.J.	30	46,XY	A, zahamowanie spermatogenezy na poziomie spermatocytów II rzędu
11	A.P.	29	46,XY	A, zahamowanie spermatogenezy na poziomie spermatocytów II rzędu
12	A.O.	32	46,XY	A, zahamowanie spermatogenezy na poziomie spermatocytów II rzędu
13	P.S.	28	46,XY	A, zahamowanie spermatogenezy na poziomie spermatogonii
14	J.N.	29	46,XY	A, szklwienie błon podstawnych kanalików nasiennych, brak komórek mitotycznych
15	M.G.	25	46,XY	A, zahamowanie spermatogenezy na poziomie spermatocytów, brak spermatyd
16	P.W.	32	46,XY	A, zahamowanie spermatogenezy na poziomie spermatocytów II rzędu

I = niepłodność idiopatyczna (prawidłowa liczba, ruchliwość i morfologia plemników); P = płodny; A = azoospermia; OA = oligoasthenozoospermia; DP = diagnostyka prenatalna

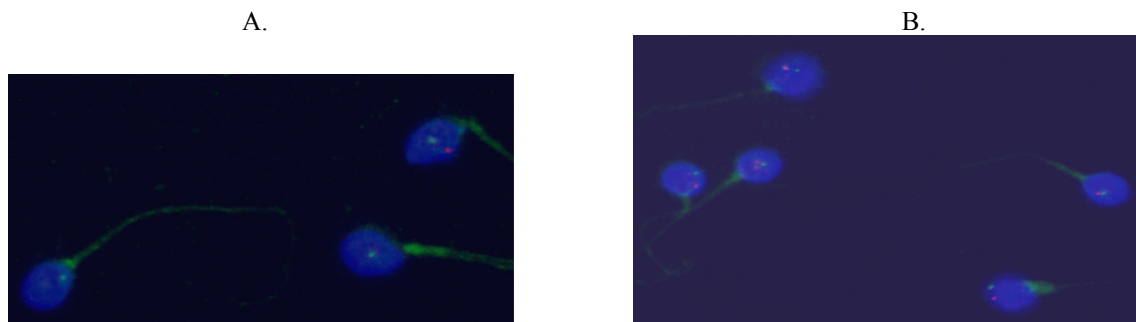
Nr 1 MA	0,02	0,05	0,04	0,03	0,01	0,01	0,07	0,05	0,13	0,14	0,04	0,01	0,06	0,03	0,00	0,08	0,10	0,12	0,03	0,09	0,26	0,29
Nr 2 SO	0,15**	0,13**	0,14**	0,15**	0,16**	0,18**	0,24**	0,22**	0,69**	0,67**	0,25**	0,33**	0,06	0,18**	0,02	0,33	0,43*	0,86*	0,04	0,09	1,16*	1,62*
Nr 3 WO	0,05	0,05	0,05	0,04	0,02	0,02	0,05	0,04	0,17	0,14	0,07	0,02	0,07	0,03	0,01	0,20	0,14	0,25	0,01	0,07	0,32	0,46
Nr 4 KA	0,09	0,10	0,06	0,05	0,11	0,05	0,10	0,10	0,36	0,29	0,15	0,09	0,20**	0,12	0,00	0,09	0,35	0,29	0,09	0,04	0,80	0,62
Nr 5 PA	0,03	0,04	0,06	0,04	0,03	0,06	0,05	0,04	0,16	0,18	0,06	0,02	0,02	0,01	0,01	0,12	0,06	0,15	0,02	0,06	0,24	0,39
Nr 6 RO	0,05	0,04	0,04	0,03	0,02	0,01	0,05	0,04	0,15	0,12	0,06	0,04	0,04	0,03	0,00	0,20	0,10	0,27	0,03	0,09	0,28	0,48
Nr 7 TK	0,10	0,10	0,13**	0,15**	0,06	0,12	0,09	0,13	0,38	0,49	0,12	0,11	0,08	0,08	0,01	0,08	0,20	0,26	0,09	0,07	0,67	0,82
Średnia K	0,07	0,07	0,08	0,07	0,06	0,07	0,09	0,09	0,29	0,29	0,11	0,09	0,08	0,07	0,01	0,16	0,20	0,32	0,04	0,07	0,53	0,67
± SD	0,05	0,04	0,04	0,05	0,06	0,07	0,07	0,07	0,20	0,21	0,07	0,12	0,06	0,06	0,01	0,10	0,14	0,25	0,03	0,02	0,35	0,45

SD – odchylenie standardowe. U każdej z osób analizowano sygnały FISH dla danego chromosomu w 5000 jąder komórkowych. Dla porównania wyników zastosowano testy χ^2 oraz U Manna-Whitneya na poziomie istotności $\alpha = 0,05$ (wartość $p < 0,05$ uznawano za różnicę istotną statystycznie). Dla sprawdzenia korelacji w poziomach hiperhaptoidii w limfocytach i plemnikach zastosowano korelację porządku rang Spearmana.

Wartości z \wedge były znacząco wyższe w porównaniu z wartością średnią K

Wartości z * były znacząco wyższe w porównaniu z wartością Średniej grupy (P, A lub K)

Wartości z \blacktriangledown były znacząco niższe w porównaniu z wartością Średniej grupy (P lub K)



Ryc. 7. Przykłady prawidłowych sygnałów FISH uzyskanych z hybridyzacji wybranych sond oraz hiperhaploidii w plemnikach (spis sond: patrz tabela 3.). A. Sygnał zielony: sonda X centromerowa; sygnał czerwony: sonda Yqh12. Prawidłowe sygnały FISH w plemniku: jeden sygnał zielony lub jeden czerwony; hiperhaploidia: jednocześnie sygnały XY. B. Sygnał zielony: sonda 13qtel; sygnał czerwony: sonda 21qtel; prawidłowe sygnały FISH w plemniku: jeden sygnał zielony i jeden czerwony; hiperhaploidia 21: dwa sygnały czerwone i jeden zielony.

Fig. 7. Examples of correct FISH signals obtained from the hybridization of selected probes and hyperhaploidy in sperm cells (see the list of probes, table 3). A. Green signal: probe Xc; red signal: probe Yqh12. Correct FISH signals in the sperm cell: one green or red signal; hyperhaploidy: simultaneous XY signals. B. Green signal: probe 13qtel; red signal: probe 21qtel; correct FISH signals in sperm cell: one green and one red signal; hyperhaploidy 21: two red signals and one red signal.

W limfocytach mężczyzn z grupy kontrolnej średnia częstość (K) hiperhaploidii poszczególnych chromosomów 13, 15, 18, 21, X i Y mieściła się w zakresie od 0,06% do 0,11% (nie było różnic statystycznych między skrajnymi wartościami odpowiednio dla chromosomów 18 i X). Średnia częstość kariotypu 48,XXYY wynosiła 0,01% a poliploidii 0,04%. Średnio, suma częstości hiperhaploidii wszystkich badanych chromosomów w limfocytach wynosiła 0,53%. W przypadku mężczyzny Nr 2 z grupy kontrolnej wyniki dotyczące prawie wszystkich badanych chromosomów (za wyjątkiem Y), w przypadku Nr 7 tylko wyniki dotyczące chromosomu 15, a w przypadku Nr 4 wyniki dotyczące chromosomu Y, były znacząco wyższe w porównaniu z wartościami średnimi dla grupy kontrolnej (tabela 14.).

W limfocytach pacjentów Nr 1 – Nr 7 z niepowodzeniami rozrodu średnia częstość (P) hiperhaploidii poszczególnych chromosomów 13, 15, 18, 21, X i Y była podobna i mieściła się w zakresie od 0,28% do 0,45% (tzn. bez różnic statystycznych między skrajnymi wartościami odpowiednio dla chromosomów 13 i 21). Średnia częstość kariotypu 48,XXYY wynosiła 0,01%, a poliploidii 0,15%. Średnio, suma częstości hiperhaploidii wszystkich badanych chromosomów w limfocytach wynosiła 2,28%. Za wyjątkiem wartości średniej dotyczącej częstości limfocytów z kariotypem 48,XXYY, pozostałe średnie (P) były znacząco wyższe w porównaniu z wartościami średnimi (K) dla grupy kontrolnej (tabela 14.). U czterech pacjentów (Nr 4, Nr 5, Nr 6 i Nr 7) indywidualne wyniki dotyczące poszczególnych chromosomów były istotnie wyższe ($p < 0,05$) niż wartości średnie (P) dla całej grupy. W przypadku pacjenta Nr 4 różnice takie dotyczyły chromosomów 13, 15 i 21, w przypadku pacjenta Nr 5 chromosomów 15, X i poliploidii, w przypadku pacjenta Nr 6 tylko chromosomu 15, natomiast w przypadku pacjenta Nr 7 chromosomu Y (tabela 14.).

W limfocytach pacjentów Nr 8 – Nr 16 z azoospermią średnia (A) hiperhaploidii poszczególnych chromosomów 13, 15, 18, 21, X i Y była podobna i mieściła się w zakresie od 0,21% do 0,39% (tzn. bez różnic statystycznych między skrajnymi wartościami odpowiednio dla chromosomów Y i X). Średnia częstość kariotypu 48,XXYY wynosiła 0,02%, a poliploidii 0,12%. Średnio, suma częstości hiperhaploidii wszystkich badanych chromosomów w limfocytach wynosiła 1,93%. Za wyjątkiem wartości średniej dotyczącej częstości limfocytów z kariotypem 48,XXYY, pozostałe średnie (A) były znacząco wyższe w porównaniu z wartościami średnimi (K) dla grupy kontrolnej. Natomiast nie stwierdzono różnic statystycznych w porównaniu z wartościami średnimi (P) obliczonymi dla pacjentów Nr 1 – Nr 7 (z niepowodzeniami rozrodu) (tabela 14.). U trzech pacjentów (Nr 13, Nr 14 i Nr 15) indywidualne wyniki dotyczące poszczególnych chromosomów były istotnie wyższe ($p < 0,05$) niż wartości średnie (A) obliczone dla całej grupy. W przypadku pacjenta Nr 13 różnice takie dotyczyły wszystkich badanych chromosomów oraz poliploidii, w przypadku pacjenta Nr 14 chromosomów 15 i 21, natomiast w przypadku pacjenta Nr 15 tylko chromosomu 15 (tabela 14.).

W plemnikach mężczyzn z grupy kontrolnej średnia (K) hiperhaploidii poszczególnych chromosomów 13, 15, 18, 21, X i Y mieściła się w zakresie od 0,07% do 0,09%. Średnia częstość plemników o kariotypie 24,XY wynosiła 0,16%, a plemników z poliploidią 0,07%. Średnio, suma częstości hiperhaploidii wszystkich badanych chromosomów w plemnikach wynosiła 0,67%. W przypadku mężczyzny Nr 2 z grupy kontrolnej wyniki dotyczące wszystkich badanych chromosomów, a w przypadku Nr 7 tylko wyniki dotyczące chromosomu 15, były znacząco wyższe w porównaniu z wartościami średnimi (K) dla tej grupy (tabela 14.).

W plemnikach pacjentów Nr 1 – Nr 7 z niepowodzeniami rozrodu średnia (P) hiperhaploidii poszczególnych chromosomów 13, 15, 18, 21, X i Y mieściła się w zakresie od 0,16% do 0,36%. Między skrajnymi wartościami odpowiednio dla chromosomów X i 21 wystąpiła różnica statystyczna ($p < 0,05$). Średnia częstość plemników o kariotypie 24,XY wynosiła 0,29%, a plemników z poliploidią 0,14%. Średnio, suma hiperhaploidii wszystkich badanych chromosomów w plemnikach wynosiła 1,88%. Za wyjątkiem wartości średniej dotyczącej częstości plemników z kariotypem 24,XX, pozostałe średnie (P) były znacząco wyższe w porównaniu z wartościami średnimi (K) grupy kontrolnej (tabela 14.).

Grupa pacjentów z niepowodzeniami rozrodu była najbardziej zróżnicowana pod względem indywidualnych wyników. U czterech pacjentów (Nr 1 oraz Nr 4 – Nr 6) indywidualne wyniki dotyczące poszczególnych chromosomów były istotnie wyższe ($p < 0,05$) niż wartości średnie (P) obliczone dla całej grupy. W przypadku pacjenta Nr 1 różnice takie dotyczyły chromosomów X i Y, w przypadku pacjenta Nr 4 chromosomów 13 i 21, w przypadku pacjenta Nr 5 chromosomu 15, natomiast w przypadku pacjenta Nr 6 chromosomu Y (tabela 14.).

Z zestawionych w tabeli 14. danych dotyczących limfocytów oraz plemników wynika, że w grupie pacjentów z niepowodzeniami rozrodu (Nr 1 – Nr 7) podwyższonej częstości aneuploidii badanych chromosomów w plemnikach towarzyszyła podwyższona częstość aneuploidii w limfocytach krwi obwodowej. Porównując wartości średnie (P) dotyczące poziomu aneuploidii chromosomów w plemnikach i limfocytach, stwierdzono asocjację w występowaniu podwyższonej (w porównaniu do wartości średnich (K)) częstości aneuploidii

chromosomów 13 (współczynnik korelacji $r = 0,95$, $p = 0,04$), 15 ($r = 0,51$, $p = 0,05$), 18 ($r = 0,84$, $p = 0,001$), 21 ($r = 0,97$, $p = 0,003$) Y ($r = 0,48$, $p = 0,04$). oraz sumy aneuploidii chromosomów X i Y ($r = 0,70$, $p = 0,01$). Podwyższona częstość disomii chromosomu X, stwierdzona tylko u dwóch pacjentów (Nr 1 oraz Nr 6), także była skorelowana z podwyższoną aneuploidią w limfocytach (odpowiednio $r = 0,63$, $p = 0,03$ oraz $r = 0,70$, $p = 0,003$).

Spośród tych pacjentów z grupy z niepowodzeniami rozrodu, których indywidualne wyniki były najwyższe w grupie, czyli istotnie wyższe niż wartości średnie P, w dwóch przypadkach (Nr 4 i Nr 5), wyjątkowo wysokiej częstości aneuploidii badanych chromosomów w plemnikach towarzyszyła również wysoka częstość aneuploidii w limfocytach krwi obwodowej. U pacjenta Nr 4 dotyczyło to aneuploidii chromosomów 13 oraz 21, natomiast u pacjenta Nr 5 chromosomu 15 (tabela 14.). Zwraca uwagę fakt, iż analogicznej obserwacji dokonano również u dwóch mężczyzn z grupy kontrolnej: u mężczyzny Nr 2 oraz Nr 7 (tabela 14.). W pierwszym przypadku dotyczyło to aneuploidii chromosomów 13, 15, 18, 21 oraz X, w drugim tylko chromosomu 15.

2.1.1. Chromosomy plemników barwione metodą GTG

U trzech pacjentów (Nr 24, Nr 29 i Nr 39 w tabeli 5., typ niepłodności I) o pozytywnym wyniku testu penetracji plemników (SPA > 30%) i znanym kariotypie somatycznym analizowano chromosomy plemnikowe metafazowe barwione Giemzą (metodą GTG). W tabeli 15. wymieniono wykryte aberracje chromosomów plemnikowych, natomiast na rycinie 8. przedstawiono przykłady tych aberracji.

Tab. 15. Aberracje chromosomów plemnikowych (barwienie GTG) zaobserwowane u trzech pacjentów z normozoospermia (I) (analizowano 100 plemników)

Tab. 15. Aberrations of sperm chromosome complements (GTG method) founded in three patients with normozoospermia (I) (out of examined 100 sperm cells)

Lp. w tab. 5	Kariotyp w limfocytach	Nieprawidłowy kariotyp w plemnikach	Liczba plemników
24.	46,XY,inv(9)(p11q12)	24,+mar 24,X,+2 25,Y,+2,+10 25,Y,+3,+10 25,Y,+2,+4	7 3 1 1 1
		Suma:	13
29.	46,XY	24,X,+4,del(4)(pter-p14) 24,Y,+4,del(4)(pter-p14) 24,X,+9 24,X,+8 24,X,+7 25,Y,+4,+9 25,X,+7,+10 25,X,+2,+10	4 2 1 1 1 1 1 1
		Suma:	12
39.	46,XY[92]/47,XXY[4]/47,XY+mar[4]	24,XY 24,+mar 24,XY,-11,+i(11) 25,XXY 26,XY,+9,+13 24,X,+8	10 7 1 1 1 1
		Suma:	21



Ryc. 8. Przykłady aberracji chromosomów plemnikowych wymienione w tabeli 15. A. Kariotyp (oraz płytka metafazowa) plemnika 24,XY (plemniki od Nr 39); B. Kariotyp plemnika 24,XY,-11,+i(11?) (plemniki od Nr39); C. Chromosomy 4 pary z płytki metafazowych trzech plemników o kariotypach 24,X,+4,del(4)(pter-p14?) (plemniki od Nr29).

Fig. 8. Example of aberrations of sperm chromosomes listed in table 15. A. Karyotype and sperm chromosome complements in case 24,XY (spermatozoa from No. 39). B. Karyotype of spermatozoon 24,XY,-11,+i(11?) (spermatozoa from No. 39). C. Chromosomes of 4th pair from methaphase smears of three spermatozoa with karyotypes 24,X,+4,del(4)(pter-p14?) (spermatozoa from No. 29).

Suma aberracji struktury i/lub liczby chromosomów plemnikowych u każdego z badanych pacjentów była wysoka i wynosiła: 13% w przypadku Nr 24, 12% w przypadku Nr 29 i 21% w przypadku Nr 39 (tabela 15). W analizie nie uwzględniano nullisomii chromosomów, gdyż brak chromosomu mógł być artefaktem. W plemnikach mężczyzn z grupy kontrolnej średnia częstość hiperhaploidii różnych chromosomów wynosiła 4%, a aberracji struktury chromosomów 5% (w tym 2% stanowiły chromosomy markerowe).

W przypadku plemników pacjenta Nr 39 zwrócił uwagę fakt, iż ponad połowę stwierdzonych aberracji (13 spośród 21) stanowiła hiperhaploidia chromosomów X i Y. W limfocytach krwi obwodowej tego pacjenta wykryto 4% metafaz z kariotypem 47,XXY, a także 4% płytek metafazowych z dodatkowym chromosomem markerowym (bez ustalonego pochodzenia). W plemnikach tego pacjenta chromosom markerowy stwierdzono w 7% komórek. Chromosom markerowy w 7% plemników stwierdzono także u pacjenta Nr 24, u którego w limfocytach krwi obwodowej stwierdzono wariant (heteromorfizm) chromosomu 9.

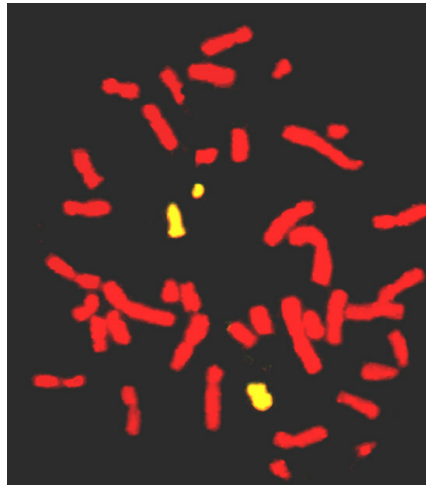
2.2. Segregacja mejotyczna chromosomu markerowego

Bezpośrednią przyczyną wykonania badań cytogenetycznych w rodzinie probanda (pacjent Nr 15 w tabeli 5.) były 3 poronienia u jego partnerki (wszystkie w pierwszym trymestrze ciąży, nie przeprowadzono analizy cytogenetycznej płodów) [315]. Kariotyp pacjenta, analizowany na płytkach metafazowych po 72-godzinnej hodowli z pełnej krwi obwodowej, określono jako 46,XY[96]/47,XY,+mar[4].fishder(20)(wcp20+,D20Z1+) (rycina 9.). U partnerki stwierdzono kariotyp 46,XX. U probanda, w jądrach interfazowych, obecność dodatkowego

chromosomu der(20) stwierdzono w 4,10% komórek [analizowano sygnały dwukolorowego FISH w 3000 jąder komórkowych; zastosowano sondy 20c red oraz 9het12 green (spis sond w tabeli 3.)] (rycina 10A). Analogiczne badanie wykonane u matki pacjenta wykazało obecność dodatkowego chromosomu der(20) w 3,14% jąder komórkowych.

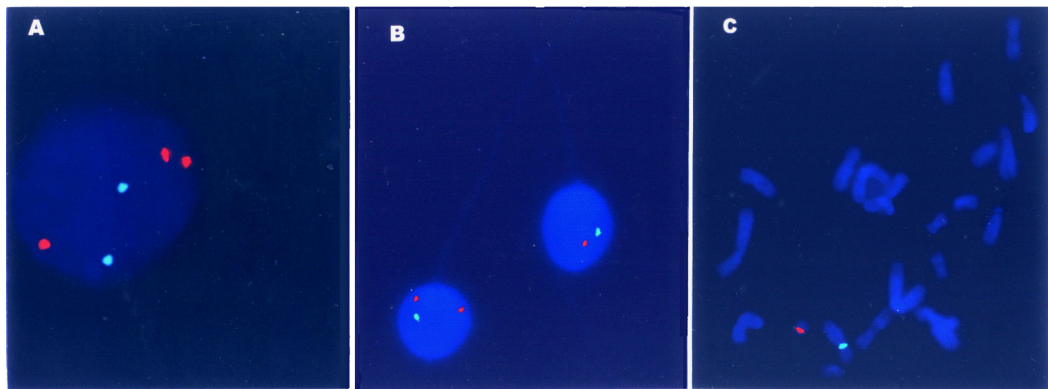
W plemnikach badanego pacjenta, a także od pięciu mężczyzn z grupy kontrolnej (K1-K5), badano metodą FISH odsetek plemników z hiperhaploidią dotyczącą chromosomów 20, 9, X oraz Y (sondy 20c red, 9het12 green, Xc green oraz Yq12 red, spis sond w tabeli 3). Wyniki te przedstawiono w tabeli 16. W 8,25% plemników badanego pacjenta stwierdzono obecność dodatkowego sygnału FISH sondy centromerowej chromosomu 20 (tabela 16., przykładowe zdjęcie plemnika z disomią chromosomu 20 – rycina 10B). W porównaniu z częstością disomii chromosomu 20 w grupie kontrolnej (0,13% ± 0,07%) był to wynik znacząco wyższy ($p < 0,001$). Wyniki dotyczące częstości plemników 24,+9, 24,XX i 24,YY nie różniły się znacząco od wyników w grupie kontrolnej. Natomiast częstość plemników 24,XY (0,29%) była znacząco wyższa od grupy kontrolnej (0,16% ± 0,10%) ($p < 0,01$) (tabela 16.).

Celem identyfikacji chromosomu markerowego der(20) w tych jądrach komórkowych plemników u badanego pacjenta, które po penetracji oocytu przekształcają się w przedjądrze męskie i tworzą metafazę, wykonano test penetracji (SPA). Do testu użyto 140 oocytów chemicznych i uzyskano pozytywny wynik penetracji w 61%. W 80 spenetrowanych oocytach uzyskano chromosomy plemnika w stadium metafazy (rycina 10C). Wśród uzyskanych płytek metafazowych, w dwóch przypadkach nie zidentyfikowano chromosomu 9, a w trzech innych chromosomu 20. W żadnej z uzyskanych metafaz nie stwierdzono dwóch sygnałów FISH identyfikujących chromosom 20.



Ryc. 9. Sygnały FISH identyfikujące chromosom 20 na płytce metafazowej limfocytów u nosiciela dodatkowego chromosomu markerowego 46,XY[96]/47,XY,+mar[4].fish der20(wcp20+) (pacjent Nr 15 w tabeli 5.) (sonda malująca 20 FITC/jodek propydyny) (spis sond w tabeli 3.).

Fig. 9. FISH signals identifying chromosome 20 on a metaphase smear of the lymphocytes in the case of a carrier of an additional marker chromosome 46,XY[96]/47,XY,+mar[4].fish der20(wcp20+) (patient No. 15 in table 5 (the list of probes in table 3)).



Ryc. 10. Sygnały FISH identyfikujące chromosomy 20 oraz 9 u nosiciela dodatkowego chromosomu markerowego 46,XY[96]/47,XY,+mar[4].fish der20(wcp20+) (pacjent Nr 15 w tabeli 5.) (sygnały czerwone: sonda 20 centromerowa; sygnały zielone: sonda 9het12) (spis sond: patrz tabela 3.). A. jądro komórkowe limfocyta, B. plemniki, C. płytka metafazowa chromosomów plemnika (brak dodatkowego sygnału chromosomu 20).

Fig. 10. FISH signals identifying chromosomes 20 oraz 9 in the case of carrier of an additional marker chromosome 46,XY[96]/47,XY,+mar[4].fish der20(wcp20+) (patient No. 15 in table 5) (red signals: probe 20c, green signals: probe 9het12) (the list of probes in table 3). A. FISH signals in lymphocyte's nucleus, B. spermatozoa, C. sperm chromosome complements (no additional chromosome 20).

Tab. 16. Procent (%) hiperhaploidii chromosomów 20, 9, X i Y (metoda FISH) w plemnikach pacjenta (P) o kariotypie 46,XY[96]/47,XY,+mar[4].fish der20 oraz w grupie kontrolnej (K1-K4)

Tab. 16. Percentage (%) of hyperhaploidy of chromosomes 20, 9, X & Y (the FISH method) in spermatozoa of a patient (P) with the kariotypie 46,XY[96]/47,XY,+mar[4].fish der20 and in the control group (K1-K4)

Chromosom	20	9	Poliploidia	X	Y	XY
Kariotyp plemnika	24,+20	24,+9	2 x (20,9)	24,XX	24,YY	24,XY
Pacjent	8,25*	0,20	0,06	0,20	0,01	0,29*
grupa kontrolna K1-K5	0,10 - 0,24	0,07 - 0,23	0,04 - 0,09	0,01 - 0,33	0,03 - 0,18	0,08 - 0,35
Srednia K ± SD	0,13±0,07	0,09±0,07	0,09±0,07	0,09±0,12	0,07±0,06	0,16±0,10

SD– odchylenie standardowe. U każdej z osób analizowano sygnały FISH dla danego chromosomu minimum w 3000 plemników.

Dla porównania wyników zastosowano test χ^2 na poziomie istotności $\alpha = 0,05$ (wartość $p < 0,05$ uznawano za różnicę istotną statystycznie).

Wartości z * były znacząco wyższe w porównaniu z wartością Średnią K ($p < 0,01$)

3. Wzory segregacji meiotycznej u nosicieli translokacji chromosomowych wzajemnych

W tabeli 17. przedstawiono kariotyp w limfocytach krwi obwodowej, wynik testu penetracji plemników (SPA) oraz typ niepowodzenia rozrodu u dziewięciu nosicieli ośmiu różnych translokacji chromosomowych wzajemnych (zrównoważonych) (TCW), dla których badano wzór segregacji meiotycznej.

Tab. 17. Kariotyp w limfocytach krwi obwodowej, wyniki testu penetracji plemników (SPA) oraz niepowodzenia rozrodu u nosicieli translokacji chromosomowych wzajemnych (TCW), dla których badano (metodą FISH) wzór segregacji meiotycznej w plemnikach

Tab. 17. Karyotype in the lymphocytes, the SPA results, and reproductive failures in carriers of TCW who were tested for meiotic segregation pattern (using the FISH method)

Nosiciel translokacji					Partnerka		Niepowodzenia rozrodu
Lp.	Inicjały	Wiek lata	Kariotyp w limfocytach	SPA %	Wiek lata	Kariotyp	
T1	Z.L.	34	46,XY,t(1;7)(p34.1;q32)	40	33	46,XX	P, zdrowa córka bez oznaczania kariotypu
T2	C.H.	25	46,XY,t(2;7)(p11.2;q22.1)	bo	25	46,XX	P, 2 poronienia, córka 46,XX po ICSI, PGD, DP
T3	D.W.	36	46,XY,t(7;13)(q34;q13)	38	26	46,XX	2 niezrównoważone genet. płody z licznymi wadami
T4	M.K.	30	46,XY,t(7;9)(q36.2;p21.2)	38	30	46,XX	P, 1 dziecko niezrównoważone genetycznie
T5	S.K.	30	46,XY,t(9;14)(p13;q13)	bo	30	46,XX	P, zdrowa córka z pierwszą żoną bez oznacz. kariotypu
T6	M.S.	37	46,XY,t(4;13)(q21;q32)	bo	33	46,XX	4 poronienia, płód : 46,XX,+13q
T7	K.K.	35	46,XY,t(4;5)(p15.1;p12)	47	33	46,XX	P, trzy poronienia, zdrowa córka bez oznacz. kariotypu
T8	S.K.	65	46,XY,t(4;5)(p15.1;p12)	38	65	46,XX	P, trzy poronienia, syn i córka, nosiciele t(4;5)
T9	R.D.	bd	46,XY,t(4;8)(p16.1;p23.1)	bo	bd	46,XX	P, 1 dziecko niezrównoważone genetycznie

bo = brak oznaczeń; bd = brak danych; P = płodny; DP = diagnostyka prenatalna; PGD – diagnostyka przedimplantacyjna, ICSI = zapłodnienie drogą docytoplazmatycznego nastrzyknięcia plemnika (intracytoplasmic sperm injection)

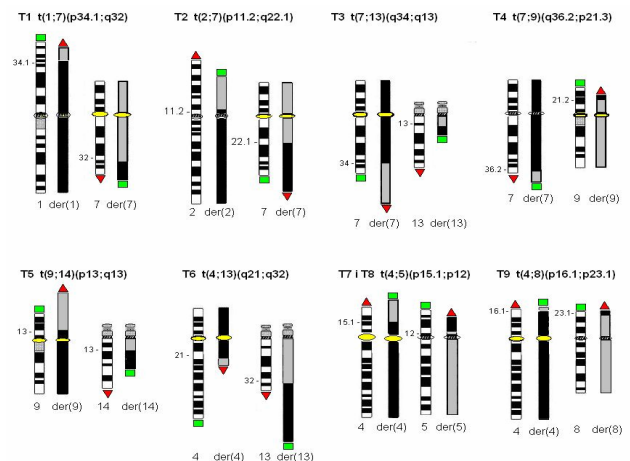
Pacjenci wymienieni w tabeli 17. jako T7 i T8 to syn i ojciec, nosiciele tej samej translokacji rodzinnej t(4;5)(p15.1;p12) [416]. Jedynie w przypadku syna (nosiciel T7) rutynowa analiza nasienia wykazała teratozoospermie (9% plemników z prawidłową morfologią wg kryteriów Krügera, przy pozostałych parametrach w normie) [310, 312].

U badanych nosicieli TCW plemniki były zdolne do zapłodnienia *in vivo*; w pięciu przypadkach (T1, T3, T4, T7 oraz T8) wykonano test SPA i także uzyskano pozytywne wyniki (SPA > 30%) (tabela 17.). W przypadku nosicieli T1, T2 oraz T7 zdrowe dzieci (wymienione w tabeli 17) przyszły na świat już po zakończeniu analiz cytogenetycznych.

Wzór segregacji meiotycznej u nosicieli T1 – T9 badano metodą trójkolorowego FISH (spis sond w tabeli 3.). Na rycinie 11A przedstawiono schematy chromosomów zaangażowanych w poszczególne translokacje wraz z lokalizacją zastosowanych sond. W przypadku każdej z badanych translokacji sygnały fluorescencyjne pochodziły od centromeru jednego z dwóch chromosomów zaangażowanych w translokację (sygnał pomarańczowy) oraz od regionów subtelomerowych tych dwóch ramion chromosomowych, w których występowała translokacja (sygnały zielony i czerwony ramion p i/lub q w zależności od translokacji). Ilustrację powyższego podejścia metodycznego przedstawiono na przykładzie

translokacji t(7;13)(q34;q13) (T3, w tabeli 17.) na rycinach 11B oraz 12. Na rycinie 11B przedstawiono graficzną ilustrację 16-stu „fluorescencyjnych fenotypów” plemników, które powstają w wyniku wszystkich typów segregacji po pierwszym podziale meiotycznym; po drugim podziale meiotycznym następuje podwojenie tego obrazu. Trzeba jednak powiedzieć, że spośród 16 przedstawionych na schemacie segregantów, na preparatach mikroskopowych można odróżnić tylko 14. Powstające w wyniku segregacji 4:0 plemniki bez sygnałów

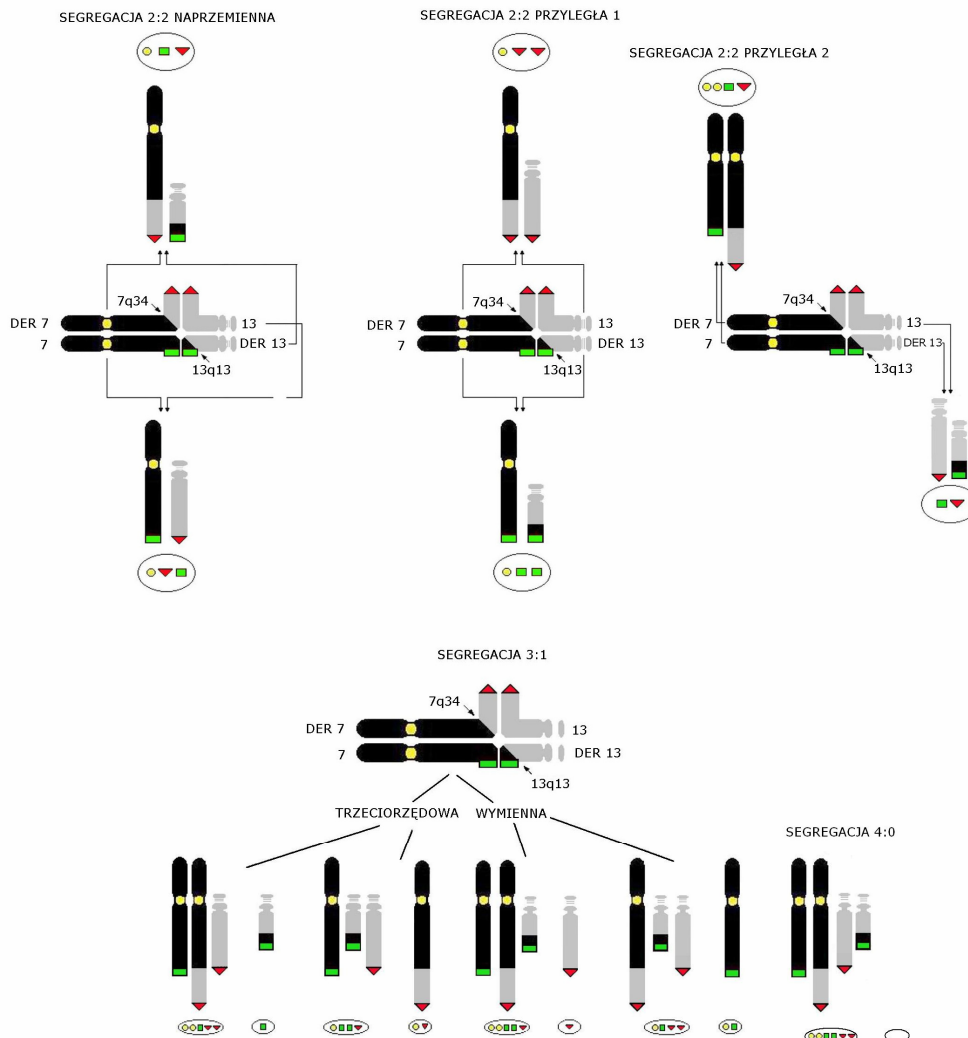
FISH są na preparatach nie do odróżnienia od plemników będącymi artefaktami. Segregacja typu 4:0 zachodzi jednak wyjątkowo rzadko a odsetek segregantów 4:0 można ewentualnie oszacować poprzez podwojenie liczby plemników z sygnałami FISH pochodzącymi ze



Ryc. 11A. Schemat chromosomów zaangażowanych w translokacje T1 – T9 z zaznaczonymi miejscami pęknięcia oraz pozycją sondy centromerowej i dwóch sond telomerowych.
Fig. 11A. Scheme of chromosomes involved in the T1 – T9 translocations with marked positions of the breakpoints and the position of one centromeric and two telomeric probes.

wszystkich czterech chromosomów zaangażowanych w daną translokację. Pewna nieścisłość tego oszacowania polega na tym, że takie same sygnały FISH mogą pochodzić z plemników diploidalnych. Ponadto plemniki, które powstają w wyniku segregacji naprzemiennej zarówno te z obydwooma chromosomami prawidłowymi, jak i zrównoważonymi, mają taki sam fenotyp fluorescencyjny. Zakłada się, że w wyniku segregacji naprzemiennej segreganty prawidłowe oraz zrównoważone powstają w proporcji 1:1. Trzeba również zaznaczyć, że w przypadkach segregacji naprzemiennej, przyległej 1 oraz 3:1 zastosowany trójkolorowy FISH nie pozwala na odróżnienie produktów rekombinacji w odcinkach inter-

stycjalnych. Po rekombinacji i segregacji naprzemiennej plemniki mają takie same sygnały FISH jak plemniki bez rekombinacji po segregacji przyległej 1 i odwrotnie. Zakłada się, że w przypadku tych translokacji, w których procent plemników po segregacji naprzemiennej i przyległej 1 jest podobny, taka konwersja wzajemnie się kompensuje. Natomiast w przypadku segregacji przyległej 2 charakterystyczne produkty rekombinacji (tzn. disomia jednego z chromosomów tworzących kwadriwalent) mają takie same sygnały FISH, jak niektóre plemniki powstałe w rezultacie błędów w drugim podziale mejotycznym po segregacji 3:1.



Ryc. 11B. Schemat kwadriwalentu oraz fluorescencyjnych sygnałów w plemnikach pochodzących z różnych typów segregacji mejotycznej w przypadku zastosowania sondy centromerowej i dwóch sond subtelerowych do znakowania chromosomów 7 i 13 u nosiciela t(7;13)(q34;q13). Sygnał pomarańczowy: sonda 7c zielona + sonda 7c czerwona (1:1); sygnał czerwony: sonda 13qtel; sygnał zielony: sonda 7qtel (spis sond w tabeli 3.).

Fig. 11B. Scheme of the quadrivalent configuration and FISH signals coming from different types of meiotic segregation after the application of one centromeric and two subteleromic probes in labeling chromosomes 7 and 13 in a t(7;13)(q34;q13) carrier.

Na rycinie 12. przedstawiono przykładowe zdjęcia sygnałów trójkolorowego FISH na chromosomach limfocytów i w plemnikach nosiciela TCW w przypadku zastosowania sondy centromerowej i dwóch sond subtelomerowych. Wzory segregacji mejotycznej stwierdzone w plemnikach badanych nosicieli T1-T9 przedstawiono w tabeli 18. U nosicieli T1-T9 znaleziono segreganty należące do wszystkich typów segregacji. Podany w tabeli 18 odsetek plemników określonych jako "genotypy nierozpoznane" dotyczy łącznie plemników mogących być artefaktami, produktami segregacji 4:0, rekombinacji i diploidii. W przypadku dwóch nosicieli translokacji rodzinnej (T7 i T8) stwierdzono podobne wzory segregacji bez różnic istotnych statystycznie. W trzech translokacjach: T1, T6 oraz T9 większość (ponad 50%) plemników była wynikiem segregacji naprzemiennej. W translokacjach T3 oraz T7-T8 segregacja naprzemienna była najczęstszym typem segregacji (ponad 34% plemników), natomiast w przypadku translokacji T2 segregacja naprzemienna była równie częsta jak segregacja przyległa 1 (ponad 33%). W dwóch segregacjach: T5 oraz T9 procent plemników po segregacji przyległej 1 i segregacji przyległej 2 był podobny, w pozostałych translokacjach powstawało więcej plemników w wyniku segregacji przyległej 1. We wszystkich translokacjach plemników powstałych w wyniku segregacji 3:1 (wymieniana łącznie z trzeciorzędową) było ponad 10%; wyjątkowo dużo, bo blisko 30% takich segregantów powstawało w przypadku translokacji T3. W przypadkach translokacji T1 oraz T3 plemników będących wynikiem segregacji 3:1 stwierdzano więcej niż po segregacji przyległej 1.

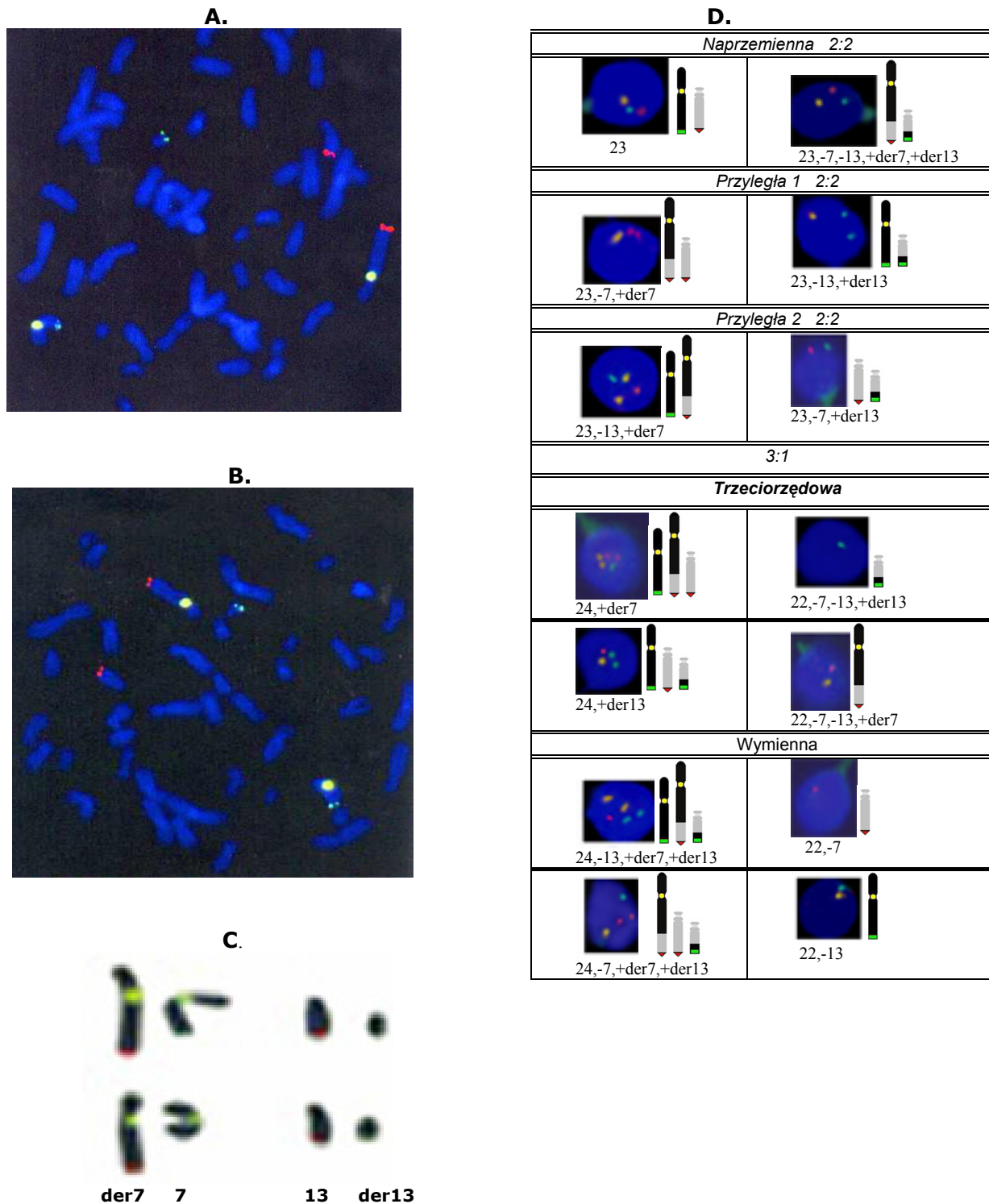
W tabeli 19. przedstawiono zestawienie wyników dotyczących wzorów segregacji mejotycznej u nosicieli translokacji z prawdopodobieństwem powodzenia lub niepowodzenia rozrodu obliczonym na podstawie danych z rodowodu danego nosiciela. Dla potrzeb zestawienia przedstawionego w tabeli 16. z danych rodowodowych wykorzystano informacje dotyczące tylko męskich nosicieli translokacji w rodzinie. W przypadku translokacji T2, T3, T4, T7 oraz T9 dane rodowodowe były wcześniej znane [316, 317, 318, 319, 320].

W przypadku nosiciela translokacji T6 wykorzystano uzyskane od rodziny dane niepublikowane. Nosiciele translokacji T1 oraz T5 nie zostali wymienieni w tabeli 19., bowiem nie było możliwości uzyskania żadnych dodatkowych informacji rodzinnych. Z zestawienia informacji w tabeli 19. wynika, iż w przypadku dwóch nosicieli (T2 oraz T3) dane rodowodowe były bardziej „optymistyczne” w porównaniu z danymi ze wzoru segregacji mejotycznej. Mianowicie, u nosicieli T2 oraz T3 odsetek plemników po segregacji naprzemiennej był stosunkowo niski i wynosił około 34%, natomiast indywidualne prawdopodobieństwo posiadania zdrowego (zrównoważonego genetycznie) potomstwa obliczone dla T2 i T3 z danych rodowodowych wynosiło około 50%. W przypadku pozostałych nosicieli (T4, T6, T7 i T9) wyniki dotyczące wzorów segregacji mejotycznej były podobne do prawdopodobieństwa powodzenia/

niepowodzenia rozrodu obliczonego na podstawie danych z rodowodu danego nosiciela.

W przypadku nosiciela translokacji $t(2;7)(p11.2;q22.1)$ (T2 w tabelach 17., 18. i 19.) istniała możliwość porównania wzoru segregacji mejotycznej nie tylko z danymi z rodowodu (tabela 19.), ale również z wynikami przedimplantacyjnego kariotypowania (PGD) ośmiu zarodków uzyskanych w wyniku ICSI (ICSI i PGD były wykonane w Cedars-Sinai Medical Center, Los Angeles, USA) [320]. W tabeli 20. przedstawiono wyniki kariotypowania (metodą FISH) ośmiu blastomerów (po jednym z każdego zarodka) oraz odpowiednich kariotypów ojcowskich. W tabeli 21. przedstawiono zestawienie odsetka powstałych zarodków o określonym kariotypie z odsetkiem ojcowskich plemników odpowiadających za taki kariotyp (na podstawie wzoru segregacji z tabeli 18.). Zarówno odsetek zarodków zrównoważonych genetycznie (37,5%), jak i zarodków powstałych w wyniku zapłodnienia plemnikiem po segregacji przyległej 1 (37,5%) był podobny do odsetka plemników po segregacji naprzemiennej (34,2%) i plemników po segregacji przyległej 1 (33,2%) (tabela 21.).

Na rycinie 13. przedstawiono sygnały FISH w plemnikach nosiciela T9 w przypadku zastosowania nieco innego podejścia metodycznego w celu uwidocznienia segregantów pochodzących z różnych typów segregacji mejotycznej. Mianowicie, zamiast (jak to opisano powyżej) kombinacji sond centromerowych i telomerowych zastosowano dwie tzw. sondy FISH malujące (ang. painting) do wyznakowania obydwóch chromosomów zaangażowanych w translokację. Do ilościowej oceny wzoru segregacji mejotycznej metoda ta była stosowana w pojedynczych przypadkach, prawdopodobnie dlatego, iż w przypadku wielu plemników, w których wyznakowane chromosomy zlokalizowane są zbyt blisko siebie interpretacja sygnałów FISH jest trudna lub wręcz niemożliwa (ponadto koszt jest istotnie wyższy w porównaniu z sondami centromerowymi i telomerowymi) [321]. Jednakże, jest to jedyny sposób znakowania plemników, w którym można odróżnić obydwie typy segregantów powstających w wyniku segregacji naprzemiennej. W przypadku nosiciela T9 stwierdzono, że plemników normalnych i zrównoważonych po segregacji naprzemiennej powstawało odpowiednio 28% i 24%.



Ryc. 12. Sygnały trójkolorowego FISH zastosowanego do znakowania chromosomów 7 i 13 u nosiciela $t(7;13)(q34;q13)$ w limfocytach (A, B oraz C) i w plemnikach pochodzących z różnych typów segregacji meiotycznej (D). Sygnał pomarańczowy: sonda 7c zielona + sonda 7c czerwona (1:1); sygnał czerwony: sonda 13qtel; sygnał zielony: sonda 7qtel (c=centromerowa; spis sond w tabeli 3.).

Fig. 12. Tri-color FISH signals applied in the labeling of chromosomes 7 and 13 in $t(7;13)(q34;q13)$ carrier lymphocytes (A, B, and C) and in sperm cells from different types of meiotic segregation (D). Orange signal: probe 7c green + probe 7c red (1:1); red signal: probe 13qtel; green signal: probe 7qtel (c=centromeric; the list of probes in table 3.).

Tab. 18. Wzory segregacji mejozycznej u badanych nosicieli translokacji chromosomowych wzajemnych (TCW)
 Tab. 18. Meiotic segregation patterns in the examined carriers of reciprocal chromosomal translocations (TCW)

Translokacja																			
Typ segregacji	T1 ¹		T2 ²		T3 ³		T4 ⁴		T5 ⁵		T6 ⁶		T7 ⁷		T8 ⁸		T9 ⁹		
	genotyp	plemnika %	genotyp	plemnika %	genotyp	plemnika %	genotyp	plemnika %	genotyp	plemnika %	genotyp	plemnika %	genotyp	plemnika %	syn	ojciec %	genotyp	plemnika %	
2:2																			
Naprzemienna	23 lub	68,0	23 lub	34,2	23 lub	34,0	23 lub	44,0	23 lub	37,1	23 lub	51,0	23 lub	34,4	34,8	23 lub	52,4		
	23,-1,-7,+der1,+der7		23,-2,-7,+der2,+der7		23,-7,-13,+der7,+der13		23,-7,-9,+der7,+der9		23,-9,-14,+der9,+der14		23,-4,-13,+der4,+der13		23,-4,-5,+der4,+der5				23,-4,-8,+der4,+der8		
Przyległa I	23,-1,+der1	4,4	23,-2,+der2	16,2	23,-7,+der7	11,2	23,-7,+der7	10,6	23,-9,+der9	10,0	23,-4,+der4	11,3	23,-4,+der4	11,1	10,4	23,-4,+der4	8,0		
	23,-7,+der7	5,5	23,-7,+der7	17,0	23,-13,+der13	12,3	23,-9,+der9	12,8	23,-14,+der14	10,8	23,-13,+der13	11,6	23,-5,+der5	13,5	12,7	23,-8,+der8	7,1		
Suma		9,9		33,2		23,5		23,4		20,8		22,9		24,6	23,1		15,1		
3:1																			
Trzeciordowa	24,+der1	1,0	24,+der2	2,1	24,+der7	3,1	24,+der7	1,9	24,+der9	1,7	24,+der4	1,7	24,+der4	1,7	2,0	24,+der4	1,1		
	22,-1,-7,+der7	2,6	22,-2,-7,+der7	0,9	22,-7,-13,+der13	5,5	22,-7,-9,+der9	2,2	22,-9,-14,+der14	1,5	22,-4,-13,+der13	2,1	22,-4,-5,+der5	2,4	2,6	22,-4,-8,+der8	1,6		
	24,+der7	1,6	24,+der7	1,2	24,+der13	1,9	24,+der9	2,0	24,+der14	1,9	24,+der13	1,0	24,+der5	3,8	3,5	24,+der8	2,2		
	22,-1,-7,+der1	1,7	22,-2,-7,+der2	1,5	22,-7,-13,+der7	2,9	22,-7,-9,+der9	2,5	22,-9,-14,+der14	2,8	22,-4,-13,+der4	1,5	22,-4,-5,+der4	2,7	3,0	22,-4,-8,+der4	3,3		
Suma		6,9		5,7		13,4		8,6		7,9		6,3		10,6	11,1		8,2		

Wymienna	24,-7, +der1,+der2	2,4	24,-7, +der2,+der7	1,6	24,-13, +der7,+der13	0,3	24,-7, +der7,+der9	1,3	24,-14, +der9,+der14	0,9	24,-13, +der4,+der13	0,8	24,-5, +der4,+der5	2,4	2,0	24,-8, +der4,+der8	0,9
	22,-1	2,3	22,-2	1,5	22,-7	2,8	22,-9	1,8	22,-9	2,3	22,-4	1,7	22,-4	1,1	1,1	22,-4	1,6
	24,-1, +der1,+der7	0,5	24,-2, +der2,+der7	1,9	24,-7, +der7,+der13	4,9	24,-9, +der7,+der9	2,0	24,-9, +der9,+der14	1,6	24,-4, +der4,+der13	1,5	24,-4, +der4,+der5	2,7	2,3	24,-4, +der4,+der8	0,9
	22,-7	1,3	22,-7	2,0	22,-13	8,0	22,-7	1,7	22,-14	2,0	22,-13	1,9	22,-5	3,3	3,2	22,-8	1,2
Suma		6,5		7,0		16,0		6,8		6,8		5,9		9,5	8,6		4,6
		13,4		12,7		29,4		15,4		14,7		12,2		20,1	19,7		12,8
genotypy nierozpoznane		3,6		5,0		5,9		4,9		3,9		2,6		5,4	5,3		6,1

Objaśnienia do tabeli 18: Sygnały FISH analizowano w minimum 3500 plemnikach każdego z nosicieli T1-T9. Dla porównania wyników w kolumnach zastosowano test Fishera na poziomie istotności $\alpha = 0,05$ (wartość $p < 0,05$ uznawano za różnicę istotną statystycznie).

Wartości w kolumnie T1¹: 68,0% > od pozostałych wyników w tej grupie ($p < 0,0001$); 13,4% > 5,1% ($p = 0,018$);

Wartości w kolumnie T2²: 34,2% oraz 33,2% > od pozostałych wyników w tej grupie ($p < 0,0005$);

Wartości w kolumnie T3³: 34,0% > od 20,8% ($p = 0,022$) oraz > od 7,2% ($p < 0,0001$); 23,5% > od 7,2% ($p < 0,0001$); 20,8% > od 7,2% ($p = 0,0004$);

Wartości w kolumnie T4⁴: 44% > od pozostałych wyników w tej grupie ($p < 0,0005$); 23,4% > od 12,3% ($p = 0,0162$);

Wartości w kolumnie T5⁵: 37,7% > od pozostałych wyników w tej grupie ($p < 0,02$); 23,5% = 14,7% ($p = 0,1077$);

Wartości w kolumnie T6⁶: 51% > od pozostałych wyników w tej grupie ($p < 0,0001$); 22,9% > od 12,2% oraz > od 11,3% ($p = 0,0162$ i $p = 0,0072$);

Wartości w kolumnie T7⁷ (= T8): 34,4% > od 15,5% oraz > od 20,1% ($p = 0,0006$ i $p = 0,0120$); 24,6% = 15,5% ($p = 0,0766$); Wartości w kolumnie T9⁹: 52% > od pozostałych wyników w tej grupie ($p < 0,0001$);

Tab. 19. Zestawienie wzoru segregacji mejotycznej ustalonego na podstawie badania kariotypów pleśniaków u nosicieli translokacji (metoda tójkolorowego FISH) z prawdopodobieństwem niepowodzenia rozrodu obliczonym na podstawie dostępnych danych rodowodowych (dotyczących tylko męskich nosicieli)
 Tab. 19. Comparison of the meiotic segregation pattern settled on the basis of the karyotyping of the sperm cells of the translocation carriers with the reproductive failure probability calculated on the basis of the available pedigree data (concerning only male carriers)

Translokacja	Dane ze wzoru segregacji mejotycznej (tabela 18.)		Dane z rodowodu	
	Typ segregacji	%		Prawdopodobieństwo
T2* t(2;7)(p11.2;q22.1)	Naprzenienna	34,2	}	56%
	Przyległa 1	33,2		
	Przyległa 2	14,9		
	3:1	12,7		
T3* t(7;13)(q34;q12)	Naprzenienna	34,0	}	50%
	Przyległa 1	23,5		
	Przyległa 2	7,2		
	3:1	29,4		
T4* t(7;9)(q36.2;p21.3)	Naprzenienna	44,0	}	53%
	Przyległa 1	23,4		
	Przyległa 2	12,3		
	3:1	15,4		
T6* t(4;13)(q21;q32)	Naprzenienna	51,0	}	56%
	Przyległa 1	22,9		
	Przyległa 2	11,3		
	3:1	12,2		
T7* t(4;5)(p15.1;p12)	Naprzenienna	34,4	}	34%
	Przyległa 1	24,6		
	Przyległa 2	15,5		
	3:1	20,1		
T9* t(4;8)(p16.1;p23.1)	Naprzenienna	52,4	}	50%
	Przyległa 1	15,1		
	Przyległa 2	13,6		
	3:1	12,8		

T2* w trzypokoleniowej rodzinie czterech męskich nosicieli miało 14 zdrowych dzieci oraz 11 niepowodzeń rozrodu (poronienia) [320].

T3* w pięciopokoleniowej rodzinie trzech męskich nosicieli miało 6 zdrowych dzieci oraz 6 niepowodzeń rozrodu (poronienia, płody z wieloma wadami) [318].

T4* obliczenia [236, 317] dotyczą indywidualnego ryzyka urodzenia żywego dziecka z nieźrównowazaniem genetycznym będącym konsekwencją segregacji przyległej 1 (26,6%) lub poronien i śmierci płodów (10% + 10%).

T6* w czteropokoleniowej rodzinie czterech nosicieli miało 5 zdrowych dzieci i 4 niepowodzenia rozrodu (poronienia, ciąża obumarła, płód 46,XX,+13q) (niepublikowane dane od pacjenta).

T7* w trzypokoleniowej rodzinie dwóch męskich nosicieli miało troje zdrowych dzieci oraz 6 niepowodzeń rozrodu (poronienia) [316].

T9* na podstawie zbiorczych danych literaturowych: [322] (analiza 46 rodowodów) oraz [319, 323].

Tab. 20. Wyniki diagnostyki przedimplantacyjnej (PGD) dotyczącej chromosomów 2, 7, 21, X i Y oraz kariotypu plemników (metoda FISH) u nosiciela t(2;7)(p11.2;q22.1) (T2 w tabelach 14., 15. i 16.)

Tab. 20. Results of the PGD diagnosis concerning chromosomes 2, 7, 21, X and Y and the karyotypes of the sperm cells of t(2;7)(p11.2;q22.1) carrier (T2) (the FISH method)

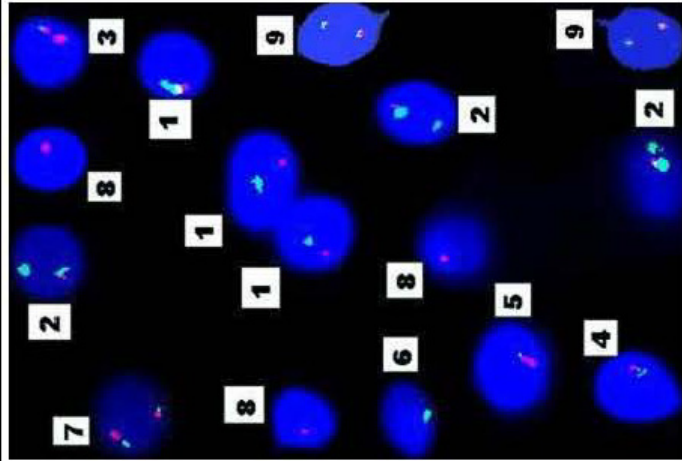
Nr zarodka	Sygnaly FISH w blastomerze	Kariotyp zarodka	Kariotyp plemnika
1	2p,2p,7p,7p,7q,7q, 21,21,X,Y	46,XY lub 46,XY,t(2;7)(p11.2;q22.1)pat	23,Y lub 23,Y,-2,-7,+der2,+der7
2	2p,7p,7p,7q,7q, X,X	46,XX,der(2)t(2;7)(p11.2;q22.1)pat monosomia 2p11.2→pter, trisomia 7q22.1→qter	23,X,-2,+der2
3	2p,2p,7p,7p,7q,7q, 21,21,X,X sygnaly 2p b. blisko	46,XX lub 46,XX,t(2;7)(p11.2;q22.1)pat	23,X lub 23,X,-2,-7,+der2,+der7
4	2p,7p,7p,7q,7q,7q, X,Y	46,XY,der(2) t(2;7)(p11.2;q22.1)pat monosomia 2p11.2→pter, trisomia 7q22.1→qter	23,Y,-2,+der2
5	2p,2p,2p,7p,7p,7q, X,Y	46,XY,der(7)t(2;7)(p11.2;q22.1)pat trisomia 2p11.2→pter, monosomia 7q22.1→qter	23,Y,-7,+der7
6	zdegenerowany, bez sygnaliów FISH	bez wyniku	?
7	2p,2p,7p,7p,7q,7q, 21,21,X,Y	46,XY lub 46,XY,t(2;7)(p11.2;q22.1)pat	23,Y lub 23,Y,-2,-7,+der2,+der7
8	2p,7p,7q,X	haploidalny?	?

? = niemożliwe do określenia

Tab. 21. Porównanie wyników karyotypowania (metoda FISH) plemników i blastomerów u nosiciela t(2;7)(p11.2;q22.1)

Tab. 21. Comparison of results of the karyotyping of sperm cells and blastomeres (the FISH method) of the t(2;7)(p11.2;q22.1) carrier

Typ segregacji	Plemniki (%)	Blastomery (%)
Naprzemienna	34.2	37.5
2:2	przyległa I 16.2 przyległa I 17.0	33.2% 25.0 12.5
3:1	12.7	0
nie rozpoznano	5.0	haploid? 12.5 12.5



Ryc. 13. Sygnaly FISH w plemnikach pochodzących z różnych typów segregacji mejozycznej u nosiciela T9 t(4;8)(p16.1;p23.1) w przypadku zastosowania sond należących do chromosomów 4 (sonda zielona) oraz chromosom 8 (sonda czerwona) (spis sond w tabeli 3). Opisane cyfryami plemniki pochodzą z następujących typów segregacji mejozycznej: (1) = naprzemienna, 23; (2) = przyległa II, 23,-8,+der4; (3) = przyległa II, 23,-4,+der8; (4) = przyległa I, 23,-8,+der8; (5) = 3:1 trzeciorzędowa, 22,-4,-8,+der8; (6) = wymienna, 22,-8; (7) = 3:1 trzeciorzędowa, 24,+der8; (8) = 3:1 wymienna, 22,-4; (9) = naprzemienna, 23,-4,-8,+der4,+der8

Fig. 13. FISH signals in sperm cells from different types of meiotic segregation in a carrier T9 t(4;8)(p16.1;p23) after the application of probes painting chromosome 4 (green probe) and chromosome 8 (red probe). (1) = alternate, 23; (2) = adjacent II, 23,-8,+der4; (3) = adjacent II, 23,-4,+der8; (4) = adjacent I, 23,-8,+der8; (5) = 3:1 tertiary, 22,-4,-8,+der8; (6) = intermediate, 22,-8; (7) = 3:1 tertiary, 24,+der8; (8) = 3:1 intermediate, 22,-4; (9) = alternate, 23,-4,-8,+der4,+der8

4. Wyniki analizy topologii chromosomów w jądrze komórkowym plemnika

4.1. Lokalizacja liniowa

4.1.1. Plemniki mężczyzn z grupy kontrolnej

Badania dotyczące wewnątrzjądrowej lokalizacji liniowej centromerów chromosomów plemnikowych wykonano na plemnikach od czterech mężczyzn z grupy kontrolnej (K1–K4) [311]. Oceniano wewnątrzjądrowe pozycje centromerów chromosomów 7, 9, 15, 18, X oraz Y w trzech obszarach: a (bliżej akrosomu), c (centrum) oraz w (bliżej witki) (wg schematu na rycinie 5.). Wyniki zarówno dla indywidualnych mężczyzn, jak i wartości średnie K przedstawiono w tabeli 22. Dodatkową ilustracją danych z tabeli 22., dotyczącą tylko wartości średnich K dla badanych chromosomów jest rycina 14. Analiza wartości średnich K wskazuje, że w większości plemników (55–68%) centromery wszystkich badanych chromosomów występowały w obszarze (c). W 19–37% plemników centromery wszystkich badanych chromosomów występowały w obszarze (a), najrzadziej, tzn. w 6–21% w obszarze (w). Spośród badanych chromosomów w obszarze (a) najczęściej (37%) obserwowano centromery X, jednocześnie w obszarze (w) występowały one najrzadziej (6%) (różnica istotna statystycznie odpowiednio dla chromosomów 7, 9 oraz 15, 18) (tabela 22., rycina 14.).

Indywidualne wyniki uzyskane dla mężczyzn z grupy kontrolnej (K1–K4) dotyczące liniowej lokalizacji centromerów chromosomów 7, 9, 15, 18, oraz X w obszarach (a), (c) i (w) nie wykazywały istotnych różnic (tabela 22.). Natomiast w przypadku lokalizacji liniowej centromeru chromosomu Y wystąpiły istotne różnice międzypersonalne. Wyniki w obszarze (a) uzyskane dla K3 różniły się zarówno od wartości średniej K, jak i od K1, K2 oraz K4, natomiast w obszarach (c) oraz (w) różniły się odpowiednio od K1 i K4 (tabela 22.).

4.1.2. Plemniki nosicieli translokacji chromosomowych wzajemnych

Badania dotyczące wewnątrzjądrowej lokalizacji liniowej centromerów chromosomów plemnikowych wykonano na plemnikach sześciu nosicieli różnych TCW (T1–T6) [311]. Charakterystykę nosicieli translokacji T1–T6 przedstawiono w tabeli 17., natomiast wzory segregacji mejozytycznej w tabeli 18. Z kolei w tabeli 23. przedstawiono informacje, które chromosomy analizowano w plemnikach poszczególnych nosicieli, jakie zastosowano sondy FISH oraz jaki był odsetek plemników po segregacji naprzemiennej i przyległej I. Badania dotyczące lokalizacji centromerów chromosomów 7, der7 i/lub 9, der9 wykonano tylko na plemnikach będących wynikiem tych dwóch typów segregacji. Plemniki te posiadały 23 chromosomy, w tym obydwa zaangażowane w daną translokację. W przypadku nosicieli T1–T4 punkty pęknięcia na chromosomie 7 były zlokalizowane na długim ramieniu (q) w bardzo zbliżonych regionach; u nosicieli T4 oraz T5 punkty pęknięcia były zlokalizowane na krótkim ramieniu (p). Oceniano wew-

nątrządrowe pozycje centromerów w trzech obszarach: (a) (bliżej akrosomu), (c) (centrum) oraz (w) (bliżej witki) (wg schematu na rycinie 5.). Wyniki, zarówno dla poszczególnych nosicieli, jak i wartości średnie K uzyskane dla grupy kontrolnej (dane z tabeli 22.) przedstawiono w tabeli 24. W związku z tym, że każda translokacja jest u niespokrewnionych nosicieli traktowana indywidualnie, nie obliczono wartości średnich dla całej grupy nosicieli, natomiast wyniki dla poszczególnych nosicieli T1–T6 odnoszono do wyników średnich obliczonych dla grupy kontrolnej (K). Celem badania lokalizacji centromerów chromosomów X i Y, które nie były zaangażowane w żadną z analizowanych translokacji było sprawdzenie, czy obecność w jądrze komórkowym plemnika chromosomów z translokacją ma wpływ na lokalizację innych chromosomów. W przypadku nosiciela T6 badano tylko lokalizację centromerów chromosomów X oraz Y, bowiem w grupie kontrolnej nie badano lokalizacji chromosomów 4 i 13. W przypadku nosiciela T2 brak danych dotyczących chromosomów X i Y wynikał z niedostatecznej ilości plemników dla przeprowadzenia wszystkich analiz. Ilustracją danych z tabeli 24. jest rycina 15.

Diagram na rycinie 15. ilustruje zestawienie wyników dotyczących liniowej lokalizacji badanych centromerów u nosicieli T1–T6 (dane z tabeli 24) oraz w grupie kontrolnej (wartości K1–K4 oraz średnie K: dane z tabeli 22.). Analiza tych wyników wskazuje na istotne różnice w lokalizacji liniowej zarówno między nosicielami T1–T6, jak i w porównaniu do wartości średnich K. W przypadku lokalizacji centromeru chromosomu 7 różnice w obszarach (a) oraz (c) stwierdzono między średnią K a wynikami dla T1; natomiast wyniki dla nosicieli T1 i T4 różniły się od T2 w obszarze (c) a między T4 oraz T2 w obszarze (w). W przypadku wyników dotyczących lokalizacji centromeru chromosomu 9 różnice w stosunku do średniej K stwierdzono w obszarach (a) i (c) dla nosicieli T4 i T5, a w obszarze (w) dla T4 (rycina 15., dane z tabeli 24.).

4.1.3. Plemniki mężczyzn z niepowodzeniami rozrodo

Badania dotyczące wewnątrzjądrowej lokalizacji liniowej centromerów chromosomów plemnikowych wykonano na plemnikach pięciu mężczyzn z niepowodzeniami rozrodo (P1 – P5), których charakterystykę przedstawiono w tabeli 25 [324]. Wspólną cechą plemników pacjentów z tej grupy był stwierdzony podwyższony poziom aneuploidii badanych chromosomów (tabela 26.). Wyniki dotyczące wewnątrzjądrowej pozycji centromerów chromosomów 15, 18, X i Y w trzech obszarach (a), (c) i (w) (wg schematu na rycinie 5.) przedstawiono w tabeli 27. Dodatkową ilustracją danych z tabeli 27. jest rycina 16. Wyniki dotyczące lokalizacji liniowej centromeru chromosomu 18 nie różniły się istotnie u żadnego z pacjentów ani od średniej P (średnia dla grupy pacjentów) ani od średniej K (średnia dla grupy kontrolnej). Natomiast takie różnice stwierdzono w przypadku chromosomów 15, X i Y. W przypadku lokalizacji liniowej centromeru chromosomu 15 wyniki pacjenta P4 różniły się w obszarach (a) oraz (w) od wyników dla pacjentów P3, P5 oraz średniej K. W przy-

padku chromosomu X różnice dotyczyły obszaru (a) w porównaniu z wynikami P1, P2 i P5. Natomiast w przypadku chromosomu Y różnice w wynikach dotyczyły obszaru (a) w porównaniu z wynikami P1, P2 oraz obszaru (w) w porównaniu z wynikami P1, P2 i średnią K.

4.1.4. Plemniki z hiperhaploidią

Wykonano analizę lokalizacji liniowej w obszarach (a), (c) i (w) w 66 jądrach komórkowych plemników z hiperhaploidią (n+1) dotyczącą jednego z badanych chromosomów (tzn. w plemnikach z podwójnymi sygnałami FISH sond centromerowych: 15,15 lub 18,18 lub XX lub YY). Plemniki te pochodziły od pacjentów P1-P5 (tabela 26). Na rycinie 17. przedstawiono porównanie średnich wartości dotyczących lokalizacji liniowej badanych centromerów w plemnikach o prawidłowym kariotypie (n = 23) zarówno w grupie kontrolnej K, jak i w grupie pacjentów P z lokalizacją w plemnikach z hiperhaploidią (n+1) (wartości średnie K oraz P z tabeli 27.). Stwierdzono różnice w wynikach dotyczących lokalizacji centromerów chromosomów 15, 18 oraz Y natomiast nie chromosomu X. W przypadku chromosomu 15 centromery 15,15 rzadziej występowały w obszarze (w) w porównaniu ze średnią wartością K. Największe różnice w dystrybucji centromerów dotyczyły chromosomów 18 oraz Y. W hiperhaploidalnych plemnikach centromery 18,18 lub Y,Y najrzadziej występowały w obszarze (a), natomiast najczęściej w obszarze (w) (w przypadku 18,18) oraz w (c) (w przypadku Y,Y) (rycina 17.).

4.1.5. Plemniki frakcjonowane

W tabeli 25. przedstawiono porównanie lokalizacji liniowej centromerów wybranych chromosomów w jądrach

plemników niefrakcjonowanych (z ejakulatu) oraz frakcjonowanych. Doświadczenia wykonano na plemnikach pochodzących z tego samego ejakulatu (od P5 wg tabeli 25.). Pierwszą frakcją plemników, tzw. frakcją 'swim-up', zawierającą tylko plemniki z ruchem postępowym szybkim, uzyskano metodą wypływania (patrz rozdział III.2.3.1.). W tej frakcji plemników badano lokalizację centromerów chromosomów 15, 18, X oraz Y. Drugą frakcją stanowiły plemniki, które odpłukano z powierzchni oocytów chemicznych (badano centromery chromosomów X i Y). Aby takie plemniki uzyskać wykonano ksenogeniczny test penetracji SPA modyfikując jego ostatni etap (patrz rozdział III.2.2.). Mianowicie, po 3,5 godzinnej inkubacji oocytów chemicznych w buforze z plemnikami, oocyty przenoszono kolejno do trzech kropli buforu (200 µl) bez plemników. Wówczas odpłukaniu ulegały plemniki zupełnie niezwiązane z powierzchnią oocytów. Następnie oocyty przenoszono do kolejnej kropli buforu i wytrząsano. Odpłukane tą drogą plemniki określono jako 'uzyskane z powierzchni oocytów'.

Przedstawione w tabeli 28. wyniki dotyczące lokalizacji centromerów w plemnikach niefrakcjonowanych (z ejakulatu P5) są powtórzeniem wyników przedstawionych wcześniej w tabeli 27. Wyniki te nie różniły się istotnie od wartości średnich dla grupy kontrolnej K (tabela 27.). W przypadku plemników z frakcji 'swim-up' stwierdzono znaczącą różnicę w lokalizacji liniowej centromeru chromosomu Y (tabela 28.). Aż w 78% plemników z tej frakcji centromer chromosomu Y zlokalizowany był w centralnej (c) części jądra plemnika.

W przypadku frakcji plemników 'z powierzchni oocytów' jedyna znacząca statystycznie różnica dotyczyła chromosomu X: w żadnym z plemników z tej frakcji centromer chromosomu X nie był zlokalizowany w części jądra komórkowego od strony wtki (w) (tabela 28.).

Tab. 22. Lokalizacja liniowa centromerów chromosomów 7, 9, 15, 18, X oraz Y w trzech obszarach (a), (c) oraz (w) jąder komórkowych plemników od mężczyzn z grupy kontrolnej (K1-K4). Wg oznaczeń w tabeli 4. inicjały są następujące: K1=M.A., K2=S.O., K3=W.O., K4=K.A. Podział jądra komórkowego plemnika na trzy obszary nazwano (a) (bliżej akrosomu), (c) (centrum) oraz (w) (bliżej wtki): wydzielone wg schematu na rycinie 5

Tab. 22. Longitudinal centromere localization of chromosomes 7, 9, 15, 18, X & Y in three nuclear areas (a), (c) & (w) of sperm cells of men from the control group (K1-K4). According to table 4, the initials are as follows: K1=M.A., K2=S.O., K3=W.O., K4=K.A. The division of the sperm cell nucleus into three regions were labeled as follows: (a) (closer to acrosome), (c) (center) and (w) (closer to the tail): the areas were marked according to the scheme in figure 5

Chromosom	7			9			15			18			X			Y		
	a	c	w	a	c	w	a	c	w	a	c	w	a	c	w	a	c	w
a = bliżej akrosomu; c = centrum w = bliżej wtki																		
K1-K4 grupa kontrolna	%			%			%			%			%			%		
K1	22	67	11	20	70	9	25	60	15	22	57	21	37	59	4	21	69	10
K2	18	69	13	nie badano			19	60	21	24	53	23	53	23	6	30	59	11
K3	18	67	14	23	71	6	27	56	17	26	56	19	39	54	7	43 ^{▼1}	51 ²	6 ³
K4	18	69	13	23	62	15	nie badano			nie badano			42	53	5	18	61	21
Średnia K±SE	19±1	68±1	13±1	22±1	68±2	10±2	23±2	59±1	18±2	24±1	55±1	21±1	37±2	58±2	6±1	28±4	60±3	12±2

SE – błąd standardowy. Dla każdego badanego chromosomu analizowano pozycję sygnałów FISH w obszarach (a, c, w) w 500 plemnikach dla każdej osoby z grupy K1-K4.

Dla porównania wyników zastosowano testy χ^2 oraz Fishera na poziomie istotności $\alpha = 0,05$ (wartość $p < 0,05$ uznawano za różnicę istotną statystycznie).

Wartość z^{∇} była znacząco różna w porównaniu z wartością średnią K ($p = 0.0350$).

Wartości z^a były znacząco różne w porównaniu z wartością średnią K dla chromosomu 7 ($p = 0.0018$) oraz dla chromosomu 9 ($p = 0.0496$) w obszarach (a) i (c).

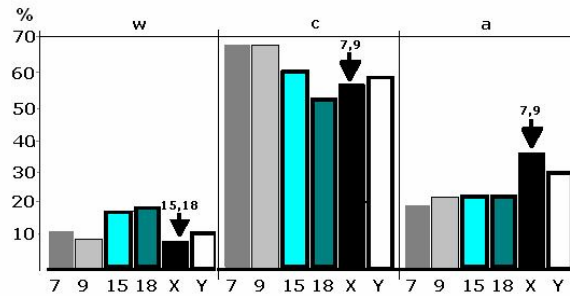
Wartość z^b była znacząco różna w porównaniu z wartością średnią K dla chromosomu 15 ($p = 0.0448$) oraz dla chromosomu 18 ($p = 0.0103$) w obszarze (w).

Wartość z^1 była znacząco różna w porównaniu z wartościami K1, K2 i K4 w obszarze (a) ($p = 0.0021$).

Wartość z^2 była znacząco różna w porównaniu z wartością K1 w obszarze (c) ($p = 0.0022$).

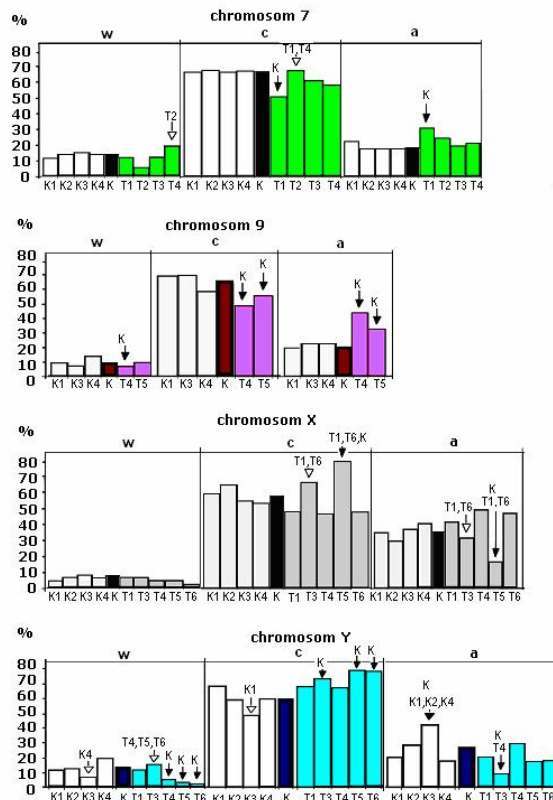
Wartość z^3 była znacząco różna w porównaniu z wartością K4 w obszarze (w) ($p = 0.042$).

różnice pomiędzy osobami dla danego chromosomu



Ryc. 14. Liniowa lokalizacja centromerów chromosomów 7, 9, 15, 18, X i Y w trzech obszarach (a), (c) oraz (w) jąder komórkowych plemników (obszary wydzielono wg schematu na rycinie 5.). Diagram przedstawia średnie wartości K obliczone dla grupy kontrolnej (dane z tabeli 22.). Strzałki wskazują, że średnie wartości K dla chromosomu X były znacząco różne od średnich wartości K dla chromosomów 7, 9 (w obszarach (a) oraz (c)), 15 oraz 18 (w obszarze (w)).

Fig. 14. Longitudinal centromere distribution of chromosomes 7, 9, 15, 18, X i Y in three sperm nuclear areas (a), (c) oraz (w) (the areas were separated according to the scheme in Fig. 5.). The diagram shows the mean values K calculated for the control group (the data from table 22.). The arrows indicate that mean values K for chromosome X were significantly different than mean values K for chromosomes 7, 9 (in areas (a) and (c)), 15 and 18 (in area (w)).



Ryc. 15. Liniowa lokalizacja centromerów chromosomów 7, 9, X i Y w trzech obszarach (a), (c) oraz (w) jąder komórkowych plemników (obszary wydzielono wg schematu na rycinie 5.). Diagram przedstawia wartości K1–K4 oraz średnie K obliczone dla grupy kontrolnej (dane z tabeli 22.) a także wartości dla nosicieli translokacji (T1–T6) (dane z tabeli 24.). Strzałki wskazują wartości znacząco różne od średnich wartości K (czarne) lub/i różnice międzyosobnicze.

Fig. 15. Longitudinal localization of the centromeres of chromosomes 7, 9, X and Y in three areas of sperm nucleus: (a), (c) & (w) (the areas were separated according to the scheme in Fig. 5.). The diagram shows values K1–K4 and mean values K calculated for the control group (the data from table 22) and also the values for the translocation carriers (T1–T6) (the data from table 24). The arrows indicate values that are considerably different from mean values K (Black) and/or intraindividual differences.

Tab. 23. Nosiciele translokacji (TCW), odsetek (%) plemników powstałych w wyniku segregacji naprzemiennej i przyległej I, chromosomy, których wewnątrzjądrową topologię badano w plemnikach (wyfuszczony druk) oraz sondy użyte do FISH. Charakterystyka nosicieli T1-T6 oraz cały wzór segregacji mejotycznej: patrz dane w tabelach 14. oraz 15. Według oznaczeń w tabeli 17. inicjały nosicieli TCW są następujące: T1=Z.Ł.; T2=C.H.; T3=D.W.; T4=M.K.; T5=S.K.; T6 = M.S.

Tab. 23. Translocation carriers (TCW), the percentage (%) of sperm cells produced as a result of alternate and adjacent I segregation, chromosomes whose intranuclear localization was studied (bold font) and the probes used in FISH. Characteristics of TCW carriers T1-T6 and meiotic segregation pattern: see data in tables 14 and 15. In table 17 the initials are as follows: T1=Z.Ł.; T2=C.H.; T3=D.W.; T4=M.K.; T5=S.K.; T6 = M.S.

T-nosiciel translokacji	Chromosom	sondy		Naprzemienna %	Przyległa I	
		centromer R=red G=green	telomer R=red G=green		kariotyp plemnika	%
T1	t(1;7)(p34.1;q32)	7 ^R , 7 ^G X ^G , Y ^R	1p ^G , 7q ^R	68.0%	(23,-7,+der7)	5.5%
T2	t(2;7)(p11.2;q22.1)	7 ^R , 7 ^G X ^G , Y ^R	2p ^R , 7q ^G	34.2%	(23,-7,+der7)	17.0%
T3	t(7;13)(q34;q13)	7 ^R , 7 ^G X ^G , Y ^R	7q ^G , 13q ^R	34.0%	(23,-7,+der7)	11.2%
T4	t(7;9)(q36.2;p21.2)	7 ^R , 7 ^G 9 ^R , 9 ^G X ^G , Y ^R	7q ^G 9p ^R	44.0%	(23,-7,+der7)	10.6%
					(23,-9,+der9)	12.8%
T5	t(9;14)(p13;q12)	9 ^R , 9 ^G X ^G , Y ^R	9p ^G , 14q ^R	37.1%	(23,-9,+der9)	10.0%
T6	t(4;13)(q21;q32)	X ^G , Y ^R		51.0%		

Tab. 24. Lokalizacja liniowa centromerów chromosomów 7, 9, X oraz Y w trzech obszarach (a), (c), (w) jąder komórkowych plemników nosicieli TCW (T1-T6). Inne dane o T1-T6: patrz tabele 17, 18, 19 i 21. Podział jądra komórkowego plemnika na trzy obszary: wg ryciny 5.

Tab. 24. Longitudinal centromere localization of chromosomes 7, 9, X and Y in three areas (a), (c), (w) of sperm nuclei of TCW carriers (T1-T6). For further data about T1-T6: see tables 17., 18., 19. i 21. The division of the sperm cell nucleus into three areas: as in figure 5.

Chromosom	7, der7			9, der9			X			Y		
	a	c	w	a	c	w	a	c	w	a	c	w
T1 - T6 nosiciele translokacji	%			%			%			%		
T1 t(1;7)	33 [▼]	55 [▼]	12	nie badano			46	49	5	23	68	9
T2 t(7;2)	26	69 ¹	5	nie badano			nie badano			nie badano		
T3 t(7;13)	21	66	13	nie badano			32 ²	63 ²	5	12 ^{▼4}	74 [▼]	14 ⁵
T4 t(7;9)	24	59	18 ³	44 [▼]	50 [▼]	5	50	48	3	30	67	3 [▼]
T5 t(9;14)	nie badano			33 [▼]	58 [▼]	9 [▼]	17 ^{▼2}	80 ^{▼2}	3	18	80 [▼]	2 [▼]
T6 t(4;13)	nie badano			nie badano			48	51	1	20	79 [▼]	1 [▼]
Średnia K* ± SE	19±1	68±1	13±1	22±1	68±2	10±2	37±2	58±2	6±1	28±4	60±3	12±2

Średnia K* dla grupy kontrolnej z Tabeli 19. SE – błąd standardowy. Dla każdego badanego chromosomu analizowano pozycję sygnałów FISH w obszarach (a), (c), (w) w 500 plemnikach każdego nosiciela translokacji T1-T6. Dla porównania wyników zastosowano testy χ^2 oraz Fishera na poziomie istotności $\alpha = 0,05$ (wartość $p < 0,05$ uznawano za różnicę istotną statystycznie).

Wartości z [▼] były znacząco różne w porównaniu z wartością średnią K (p w zakresie od 0.0001 do 0.0403).

Wartość z ¹ była znacząco różna w porównaniu z wartościami T1 i T4 (p = 0.0077).

Wartości z ² były znacząco różne w porównaniu z pozostałymi wynikami w tej grupie (p=0.0016).

Wartość z ³ była znacząco różna w porównaniu z wartością T2 (p = 0.0077).

Wartość z ⁴ była znacząco różna w porównaniu z wartością T4 (p = 0.0082).

Wartość z ⁵ była znacząco różna w porównaniu z wartościami T4, T5 i T6 (p = 0.0087).

Tab. 25. Charakterystyka mężczyzn, u których badano (metodą FISH) poziom aneuploidii chromosomów 7, 9, 15, 18, X i Y oraz wewnątrzjądrową topologię tych chromosomów w plemnikach

Tab. 25. Characteristics of men tested for the aneuploidy level of chromosomes 7, 9, 15, 18, X and Y and the intranuclear topology of these chromosomes in sperm cells (using the FISH method)

	Inicjały	Wiek (lata)	Kariotyp w limfocytach	Typ niepowodzenia rozrodu
P1	A.A.	37	46,XY	OA
P2	L.W.	37	46,XY	I
P3	M.G.	29	46, XY,9qh+	OA, <i>in vitro</i> – zarodki, nie implantowały
P4	G.H.	40	46,XY	P, DP: 47,XX,+21, druga ciąża DP: 47,XY,+13
P5	T.N.	bd	46,XY	I

I = niepłodność idiopatyczna (prawidłowa liczba, ruchliwość i morfologia plemników); P = płodny;
OA = oligoasthenozoospermia, DP = diagnostyka prenatalna, bd = brak danych

Tab. 26. Częstość (%) aneuploidii chromosomów 13, 15, 18, 21, X i Y (metoda FISH) w plemnikach mężczyzn z niepowodzeniami rozrodu (P1-P5) oraz grupy kontrolnej (K1-K4)

Tab. 26. Frequencies (%) of aneuploidy of chromosomes 13, 15, 18, 21, X and Y (the FISH method) in sperm cells of men with reproductive failure (P1-P5) and the control group (K1-K4)

Chromosom	13	15	18	21	Suma aneuploidii autosomów	X	Y	X + Y	Suma aneuploidii X i Y	Poliploidia 2n	Suma aneuploidii autosomów, X, Y i poliploidii
P niepowodz. rozrodu	24,+13	24,+15	24,+18	24,+21		24,XX	24,YY	24,XY			
P1	0,27 [^]	0,29 [^]	0,13	0,31 [^]	1,00 [^]	0,31*	0,37*	0,36 [^]	1,04*	0,06 [▼]	2,10 [^]
P2	0,26 [^]	0,24 [^]	0,20 [^]	0,38 [^]	1,13 [^]	0,12	0,01	0,21	0,35	0,22 [^]	1,70 [^]
P3	0,37 [^]	0,25 [^]	0,30 [^]	0,32 [^]	1,23 [^]	0,12	0,23 [^]	0,20	0,56 [^]	0,20 [^]	1,99 [^]
P4	0,42*	0,04 [▼]	0,08 [▼]	0,50 ^{^*}	1,03 [^]	0,03 [▼]	0,06	0,33 [^]	0,41	0,13	1,56 [▼] [^]
P5	0,30 [^]	0,42*	0,27 [^]	0,30 [^]	1,29 [^]	0,10	0,07	0,25 [^]	0,42	0,18 [^]	1,81 [^]
Średnia P ± SD	0,32 [^] 0,08	0,25 [^] 0,13	0,20 [^] 0,09	0,36 [^] 0,08	1,14 [^] 0,10	0,14 0,10	0,15 [^] 0,14	0,27 [^] 0,07	0,56 [^] 0,28	0,16 [^] 0,06	1,83 [^] 0,22
K grupa kontr.											
K1	0,05	0,03	0,01 [▼]	0,05	0,14	0,01 [▼]	0,03	0,08	0,12	0,09	0,29
K2	0,13*	0,15*	0,18*	0,22*	0,67*	0,33*	0,18*	0,35*	0,86*	0,09	1,62*
K3	0,05	0,04	0,02	0,04	0,14	0,02	0,03	0,20	0,25	0,07	0,46
K4	0,10	0,05	0,05	0,10	0,29	0,09	0,12	0,09	0,29	0,04	0,62
Średnia K ± SD	0,08 0,04	0,07 0,05	0,07 0,07	0,10 0,07	0,31 0,21	0,11 0,12	0,09 0,06	0,18 0,10	0,38 0,25	0,07 0,02	0,74 0,45

SD – odchylenie standardowe. U każdej z osób analizowano sygnały FISH dla danego chromosomu minimum w 3000 plemników. Dla porównania wyników zastosowano testy χ^2 oraz U Manna-Whitney'a na poziomie istotności $\alpha = 0,05$ (wartość $p < 0,05$ uznawano za różnicę istotną statystycznie).

Wartości z [^] były znacząco wyższe w porównaniu z wartością Średnią K;

Wartości z * były znacząco wyższe w porównaniu z wartością Średniej grupy (odpowiednio P lub K);

Wartości z [▼] były znacząco niższe w porównaniu z wartością Średniej grupy (odpowiednio P lub K)

Tab. 27. Lokalizacja liniowa centromerów chromosomów 15, 18, X oraz Y w trzech obszarach (a), (c) i (w) jąder komórkowych plemników męczyzn z niepowodzeniami rozrodu (P1–P5). Podział jądra komórkowego plemnika na trzy obszary: wg schematu na rycinie 5.

Tab. 27. Longitudinal centromere localization of chromosomes 15, 18, X and Y in three areas (a), (c) and (w) in sperm cell nuclei of men with reproductive failure (P1–P5). The division of the sperm cell nucleus into three areas: as in the scheme in figure 5.

Chromosom	15			18			X			Y		
	a	c	w	a	c	w	a	c	w	a	c	w
a=blżej akrosomu; c=centrum w = bliżej witki												
P1 – P5 niepowodzenia rozrodu	%			%			%			%		
P1	nie badano			nie badano			30	61	9	16 ^{▼4}	70	14
P2	nie badano			nie badano			31	65	4	21	66	13
P3	26	56	18	20	58	23	nie badano			nie badano		
P4	40 ^{▼P1}	51	9 ^{▼2}	20	54	26	44 ³	51	5	33 ⁵	62	5 ^{▼6}
P5	16 ^P	63	21	20	54	26	31	60	9	29	60	11
Średnia P ± SE	27±7	57±4	16±4	20±0	55±1	25±1	34±3	59±3	7 ^b ±1	25±4	65±2	11±2
Średnia K* ± SE	23±2	59±1	18±2	24±1	55±1	21±1	37±3	58±3	6 ^a ±1	28±5	60±4	12±3

Średnia K* dla grupy kontrolnej z tabeli 22. SE–błąd standardowy. Dla każdego badanego chromosomu analizowano pozycję sygnałów FISH w obszarach (a), (c) i (w) w 500 plemnikach każdego z męczyzn P1-P5. Dla porównania wyników zastosowano testy χ^2 oraz Fishera na poziomie istotności $\alpha = 0,05$ (wartość $p < 0,05$ uznawano za różnicę znaczącą statystycznie).

Wartości z [▼] były znacząco różne w porównaniu z wartością średnią K (p w zakresie od 0.0042 do 0.0381).
Wartość z ^P była znacząco różna w porównaniu z wartością średnią P ($p = 0.0304$).

Wartość z ^a była znacząco różna w porównaniu z wartością średnią K dla chromosomu 15 ($p = 0.0448$) i chromosomu 18 ($p = 0.0103$) w obszarze (w).
Wartość z ^b była znacząco różna w porównaniu z wartością średnią P dla chromosomu 15 ($p = 0.0448$) i chromosomu 18 ($p = 0.0103$) w obszarze (w).
(Wartości z ^{a-b} = różnice pomiędzy chromosomami)

Wartość z ¹ była znacząco różna w porównaniu z wartościami P3 ($p = 0.0233$) i P5 ($p = 0.0378$).
Wartość z ² była znacząco różna w porównaniu z wartościami P3 ($p = 0.0285$) i P5 ($p = 0.0041$).
Wartość z ³ była znacząco różna w porównaniu z wartościami P1 ($p = 0.0322$), P2 oraz P5 ($p = 0.0497$)
Wartość z ⁴ była znacząco różna w porównaniu z wartością P5 ($p = 0.0110$).
Wartość z ⁵ była znacząco różna w porównaniu z wartościami P1 ($p = 0.0011$) i P2 ($p = 0.0338$).
Wartość z ⁶ była znacząco różna w porównaniu z wartościami P1 ($p = 0.0086$) i P2 ($p = 0.0184$).
(Wartości z ¹⁻⁶ = różnice pomiędzy osobami dla danego chromosomu)

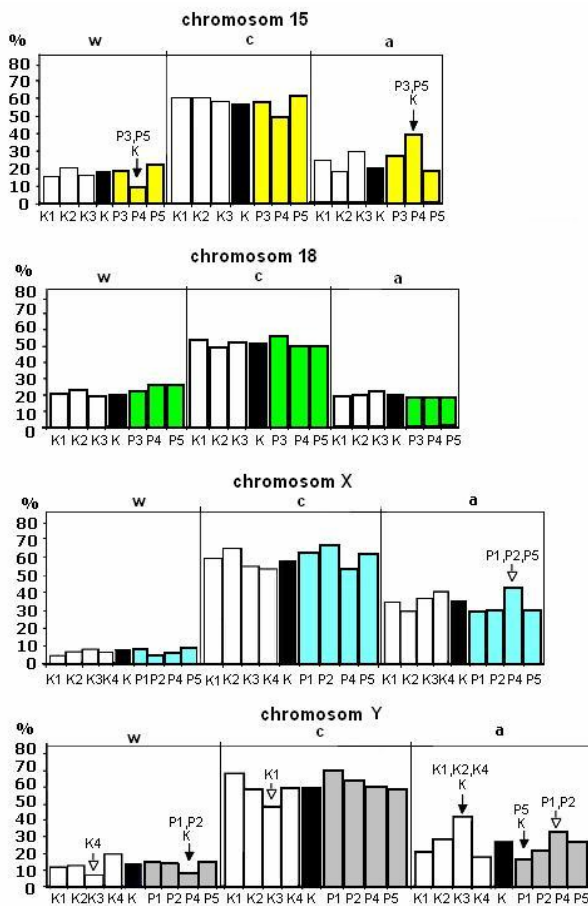
Tab. 28. Porównanie lokalizacji liniowej centromerów chromosomów 15, 18, X oraz Y w plemnikach z ejakulatu oraz z określonej jego frakcji. Oprócz niefrakcjonowanych plemników z ejakulatu, badano także frakcję plemników 'swim up' oraz plemniki, które odplukano z powierzchni oocytów chemicznych w trakcie wykonania testu SPA. Plemniki pochodziły od pacjenta P5 wg tabeli 25. Podział jądra komórkowego plemnika na trzy obszary: (a), (c) oraz (w): wg schematu na rycinie 5.

Tab. 28. Comparison of longitudinal centromere localization of chromosomes 15, 18, X and Y in spermatozoa from ejaculate and its specific fractions. Apart from the non-fractionated sperm cells, also the 'swim up' fraction and sperm cells eluted from the surface of hamster oocytes during the SPA procedure. The sperm cells were from the patient P5 in table 25. The division of the sperm cell nucleus into three regions were labeled as follows: (a), (c) and (w): the areas were marked as in the scheme in figure 5.

Chromosom	15			18			X			Y		
	a	c	w	a	c	w	a	c	w	a	c	w
a=blżej akrosomu; c=centrum w = bliżej witki												
Plemniki:	%			%			%			%		
z ejakulatu	16	63	21	20	54	26	31	60	9	29	60	11
frakcja 'swim up'	12	65	23	18	52	30	28	62	10	17 ³	78 ²	5 ⁴
z powierzchni oocytów	nie badano			nie badano			35	65	0 ¹	22	64	14

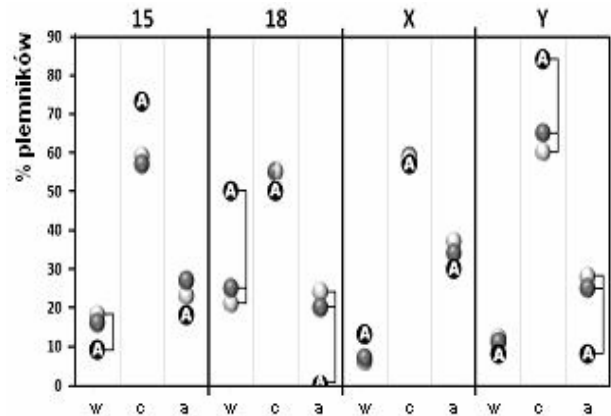
Dla każdego badanego chromosomu analizowano pozycję sygnałów FISH w obszarach (a, c, w) w 500 plemnikach.
Dla porównania wyników zastosowano test Fishera na poziomie istotności $\alpha = 0,05$ (wartość $p < 0,05$ uznawano za istotną różnicę)

Wartość z ¹ była znacząco niższa w porównaniu z innymi wartościami w grupie (w) ($p < 0.0001$)
Wartość z ² była najwyższa w grupie (c) ($p = 0.040$)
Wartość z ³ była znacząco niższa w porównaniu z wartością 29% w grupie (a) ($p < 0.021$)
Wartość z ⁴ była znacząco niższa w porównaniu z wartością 14% w grupie (w) ($p < 0.009$)



Ryc. 16. Liniowa lokalizacja centromerów chromosomów 15, 18, X i Y w trzech obszarach (a), (c) oraz (w) jąder komórkowych plemników (podział na obszary wg schematu na rycinie 5.). Diagram przedstawia wartości K1–K4 oraz średnie K obliczone dla grupy kontrolnej (dane z tabeli 22.) a także wartości dla grupy z niepowodzeniami rozrodu (P1–P5) (dane z tabeli 27). Strzałki wskazują wartości istotnie różne od średnich wartości K (czarne) lub/i różnicę międzyosobniczą.

Fig. 16. Linear localization of centromeres of chromosomes 15, 18, X & Y in three areas of sperm nuclei: (a), (c) oraz (w) (the areas were separated according to the scheme in Fig.5.). The diagram shows values K1–K4 and mean values K calculated for the control group (the data from table 22) and also the values for the group with reproductive failures (P1–P5) (the data from table 27). The arrows indicate values that are considerable different from mean values K (black) and/or intraindividual differences.



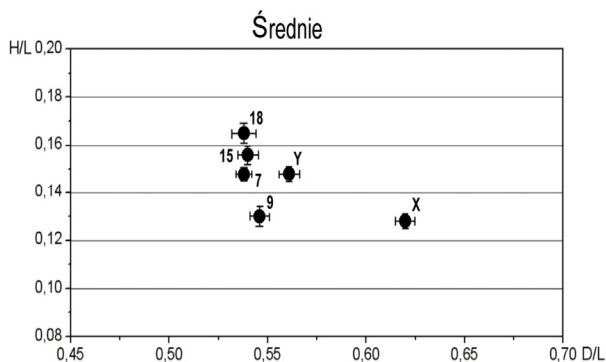
Ryc. 17. Porównanie liniowej lokalizacji centromerów chromosomów 15, 18, X oraz Y w trzech obszarach (a), (c) i (w) (wg schematu na rycinie 5.) jąder komórkowych plemników o prawidłowym kariotypie ($n = 23$) oraz plemników z hiperhaploidią ($n+1$). Jasne kulki ilustrują wartości średnie (K) dotyczące liniowej lokalizacji centromerów badanych chromosomów w grupie kontrolnej (dane z tabeli 19.); szare kulki ilustrują wartości średnie (P) dla grupy pacjentów (dane z tabeli 27.). Czarna kulki z „A” ilustrują wartości średnie dotyczące lokalizacji centromerów 15,15 lub 18,18 lub XX lub YY w jądrach komórkowych plemników z hiperhaploidią ($n = 24$). Wartości „A” i K i/lub P, które wykazały znaczące statystycznie różnice ($p < 0,05$) połączone są linią.

Fig 17. The comparison of linear localization of centromeres of chromosomes 15, 18, X & Y in three areas: (a), (c) oraz (w) (the areas were separated according to the scheme in Fig.5.) of sperm nuclei with a normal karyotype ($n = 23$) and sperm cells with hyperhaploidy ($n+1$). The bright bullets illustrate the mean values (K) that concern the longitudinal localization of centromeres of examined chromosomes in the control group (the data from table 19); the grey bullets illustrate the mean values (P) for the group of patients (the data from table 27). The black bullets with „A” illustrate the mean values concerning the localization of centromeres 15,15 lub 18,18 or XX or YY in the nuclei of sperm cells with hyperhaploidy ($n = 24$). The values „A” & K and/or P, which indicated considerable statistical differences ($p < 0,05$) are connected by the line.

4.2. Lokalizacja radialna

4.2.1. Plemniki mężczyzn z grupy kontrolnej

Wewnątrzjądrową radialną lokalizację centromerów chromosomów 7, 9, 15, 18, X i Y określano w plemnikach mężczyzn z grupy kontrolnej (K1–K4) mierząc parametry D/L oraz H/L wg schematu objaśnionego na rycinie 6A [311]. Wartości D/L oraz H/L zarówno dla indywidualnych mężczyzn, jak i średnie K przedstawiono w tabeli 29. Porównując wartości D/L i H/L obliczone dla indywidualnych mężczyzn z grupy kontrolnej (K1–K4) między sobą, a także ze średnią K, stwierdzono różnice międzysobnicze dotyczące radialnej lokalizacji centromerów chromosomów 9, X i Y, ale nie chromosomu 7 (tabela 29.). W przypadku chromosomu 9 wyniki dla K1, a w przypadku chromosomu X wyniki dla K4 różniły się od średniej K. Największe różnice zaobserwowano w lokalizacji centromeru chromosomu Y: wszystkie indywidualne wyniki K1 – K4 różniły się między sobą, a wyniki dla K1, K3 oraz K4 były różne od średniej K. Dodatkową ilustracją danych z tabeli 29., dotyczącą tylko średniej (tzw. preferencyjnej) lokalizacji radialnej centromerów badanych chromosomów jest rycina 18. Średnia radialna lokalizacja centromerów chromosomów 7, 9, 15, 18 i Y była podobna, aczkolwiek lokalizacja centromeru chromosomu 18 była bardziej zbliżona do peryferium jądra plemnika w porównaniu do centromerów chromosomów 9 i X zlokalizowanych bliżej centrum jądra plemnika. Jednocześnie centromer chromosomu X zlokalizowany był najbliżej części akrosomowej jądra plemnika.



Ryc. 18. Średnia (preferencyjna) wewnątrzjądrowa radialna lokalizacja centromerów chromosomów 7, 9, 15, 18, X oraz Y w plemnikach mężczyzn z grupy kontrolnej (K1 – K4). Pozycje czarnych kropek wyznaczono na podstawie wartości średnich K z tabeli 25. (parametry D/L i H/L wg ryciny 6.).
 Fig. 18. Mean (preferential) intranuclear radial localization of centromeres of chromosomes 7, 9, 15, 18, X and Y within sperm cells of men from the control group (K1 – K4). The positions of the black spots were determined on the basis of mean values K from table 25 (parameters D/L i H/L according to Fig. 6).

4.2.2. Plemniki nosicieli translokacji chromosomowych wzajemnych

Wewnątrzjądrową radialną lokalizację centromerów chromosomów 7, der7, 9, der9, X i Y określano w plemnikach sześciu nosicieli TCW (T1–T6) [31]. Wartości D/L oraz H/L (wg ryciny 6A) obliczone dla indywidualnych nosicieli translokacji T1 – T6 przedstawiono w tabeli 30. Wyniki dla nosicieli T1–T6 porównano ze średnimi K obliczonymi dla grupy kontrolnej (dane z tabeli 29.). U wszystkich nosicieli stwierdzono różnice w porównaniu ze średnimi K. W przypadku chromosomów 7 oraz der7, tylko wyniki dla T4 nie różniły się od średniej K. W przypadku chromosomów X wyniki dla T1 i T6 nie różniły się od średniej K, a w przypadku chromosomu Y wyniki dla T4 nie różniły się od średniej K. Ilustrację danych z tabeli 29. oraz z tabeli 30. dotyczących różnic w radialnej lokalizacji centromerów badanych chromosomów między grupą kontrolną (K1–K4) a grupą nosicieli translokacji (T1–T6) stanowi rycina 19. Natomiast na rycinie 20. porównano schematyczne obszary wewnątrz jądra komórkowego plemnika, w których zlokalizowano wszystkie badane centromery w grupie kontrolnej (K1–K4) oraz w grupie nosicieli translokacji (T1–T6) (schemat wg ryciny 6B, wartości D/L i H/L z tabeli 29. i tabeli 30.). W obydwóch porównywanych grupach centromery zlokalizowane były na stosunkowo niewielkim obszarze. Taki obszar potencjalnie stanowi fragment chromocentrum, które tworzy zgrupowanie wszystkich 23 centromerów chromosomów plemnika. W porównaniu z grupą kontrolną, obszar ten u nosicieli translokacji był rozszerzony w stronę akrosomowej części plemnika i nieco przesunięty w stronę peryferyjną (rycina 20.).

Tab. 29. Lokalizacja radialna centromerów chromosomów 7, 9, 15, 18, X oraz Y w plemnikach mężczyzn z grupy kontrolnej (K1-K4). Wg oznaczeń w tabeli 1. inicjały mężczyzn z grupy kontrolnej są następujące: K1=M.A., K2=S.O., K3=W.O., K4=K.A. Parametry D/L oraz H/L wg schematu na rycinie 6.

Tab. 29. Radial centromere localization of chromosomes 7, 9, 15, 18, X and Y in sperm cells of men from control group (K1-K4). According to the marking in table 1, the initials of men are as follows: K1=M.A., K2=S.O., K3=W.O., K4=K.A. The D/L and H/L parameters: as in the scheme in figure 6.

Chromosom	7		9		15		18		X		Y		
	średnia	SE	średnia	SE	średnia	SE	średnia	SE	średnia	SE	średnia	SE	
K1-K4 = grupa kontrolna	D/L	0.536	0.007	0.552	0.010	0.562	0.008	0.500 ^{1*}	0.010	0.607 ^c	0.009	0.522 ³	0.007
	H/L	0.153	0.006	0.153 ¹	0.008	0.155	0.006	0.157	0.008	0.140	0.005	0.158	0.006
K2	D/L	0.533	0.008	nie badano		0.511 ¹	0.008	0.543	0.010	0.634 ^c	0.010	0.577 ^{4e}	0.009
	H/L	0.157	0.006			0.173	0.006	0.174	0.006	0.140 ^{ab}	0.005	0.157	0.006
K3	D/L	0.553	0.008	0.562 ²	0.008	0.550	0.008	0.573 ¹	0.009	0.609 ^d	0.009	0.627 ^{1d}	0.009
	H/L	0.146	0.005	0.124 ^a	0.006	0.139 ²	0.006	0.163 ^c	0.006	0.133	0.006	0.148	0.006
K4	D/L	0.531	0.008	0.525	0.008	nie badano		nie badano		0.627 ^c	0.010	0.513 ¹	0.008
	H/L	0.138	0.006	0.125	0.005					0.100 ^{1c}	0.006	0.126 ¹	0.006
Średnia K	D/L	0.538	0.004	0.546	0.005	0.540	0.005	0.538	0.006	0.620 ^c	0.005	0.561 ^f	0.005
	H/L	0.148	0.003	0.130 ^b	0.004	0.156	0.004	0.165 ^d	0.004	0.128 ^b	0.003	0.148	0.003

Średnia – średnie wartości D/L oraz H/L dla pozycji sygnałów FISH badanych centromerów w 150 plemnikach; **SE** – błąd standardowy. Znaczące różnice pomiędzy wartościami oznaczone cyframi np. 0.100¹, odnoszą się do różnic między osobami. Natomiast wartości oznaczone literami np. 100^c, odnoszą się do różnic pomiędzy chromosomami. Dla porównania wyników zastosowano jednokierunkową analizę wariancji (one-way ANOVA) oraz test U Manna-Whitneya na poziomie istotności $\alpha = 0.05$ (wartość $p < 0.05$ uznawano za różnicę istotną statystycznie).

Wartości z ¹ były znacząco różne w porównaniu z wartością średnią K
Wartości z ^P były znacząco różne w porównaniu z wartością średnią P

Wartości z ¹ były znacząco różne w porównaniu z resztą wyników w tej grupie

Wartość z ² była znacząco różna w porównaniu z wynikiem dla K2

Wartość z ³ była znacząco różna w porównaniu z wynikami dla K2 oraz K3

Wartości z ⁴ były znacząco różne w porównaniu z wynikami dla K3 oraz K4

Wartości z ^{*} była znacząco różna w porównaniu z wartościami średnimi K dla pozostałych chromosomów

Wartości z ^a były znacząco różne w porównaniu z wynikami dla chromosomu 15

Wartości z ^b były znacząco różne w porównaniu z wynikami dla chromosomu 18

Wartości z ^c były znacząco różne w porównaniu z wynikami dla pozostałych chromosomów

Wartości z ^d były znacząco różne w porównaniu z wynikami dla chromosomu Y

Wartości z ^e były znacząco różne w porównaniu z wynikami dla chromosomów 7 oraz X

Wartości z ^f były znacząco różne w porównaniu z wynikami dla chromosomu 7

roźnice pomiędzy osobami

roźnice pomiędzy chromosomami

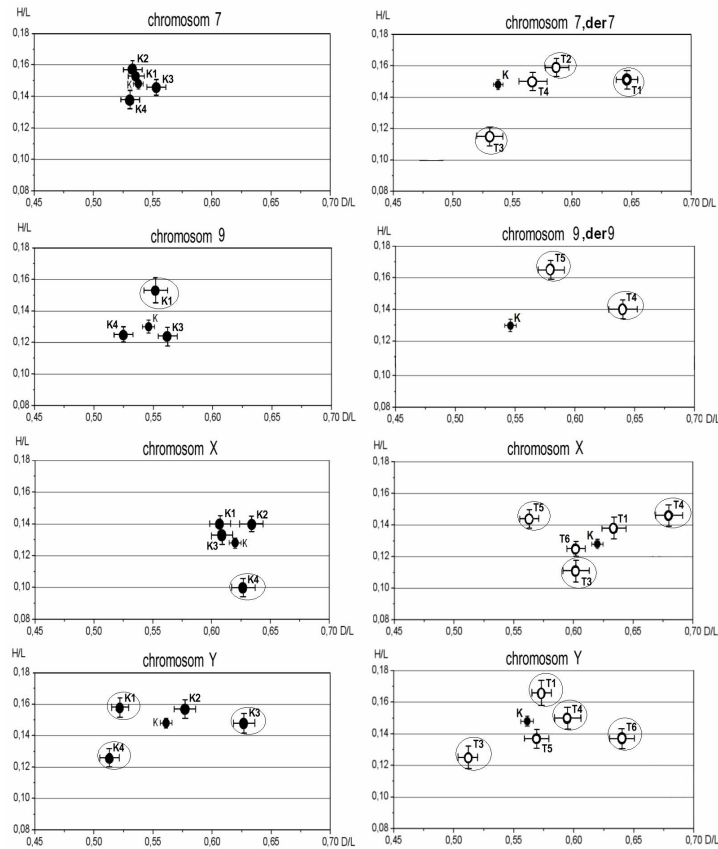
Tab. 30. Lokalizacja radialna centromerów chromosomów 7, 9, X oraz Y w plemnikach nosicieli translokacji (T1–T6) oraz porównanie ze średnią wartością K obliczoną dla grupy kontrolnej (K1–K4) (dane w tabeli 29). Pozostałe dane o nosicielach T1–T6: patrz tabele 17, 18, 19 i 23. Wg oznaczeń w tabeli 1. inicjały osób z grupy kontrolnej są następujące: K1 = M.A., K2 = S.O., K3 = W.O., K4 = K.A. Parametry D/L oraz H/L: wg schematu na rycinie 6.
 Tab. 30. Radial centromere localization of chromosomes 7, 9, X & Y in sperm cells of carriers (T1–T6) and its comparison with the mean value K, calculated for the control group (K1–K4) (the data in tab. 29). The remaining data for carriers T1–T6: see tables 17, 18, 19 & 23. In tab. 1 initials of men from control group are: K1 = M.A., K2 = S.O., K3 = W.O., K4 = K.A. The D/L & H/L parameters: see Fig. 6.

Chromosom		7, der7		9, der9		X		Y	
T = nosiciele translokacji		Średnia	SE	Średnia	SE	Średnia	SE	Średnia	SE
T1	D/L	0.646 ^{▼1}	0.009	nie badano		0.634	0.010	0.573 [*]	0.008
	H/L	0.151	0.006						
T2	D/L	0.587 ^{▼2}	0.010	nie badano		0.138	0.007	0.166 ^{▼6h}	0.008
	H/L	0.159	0.006						
T3	D/L	0.531	0.011	nie badano		0.602 [*]	0.011	0.512 ^{▼1}	0.008
	H/L	0.115 ^{▼1}	0.006						
T4	D/L	0.567 ⁹	0.012	0.640 ^{▼3}	0.012	0.680 ^{▼1b}	0.011	0.595 [▼]	0.011
	H/L	0.150	0.006						
T5	D/L	nie badano		0.140 ³	0.006	0.146 [▼]	0.007	0.150	0.007
	H/L								
T6	D/L	nie badano		0.165 ^{▼*}	0.006	0.144 [▼]	0.006	0.137	0.006
	H/L								
Średnia K	D/L	0.538	0.004	0.546	0.005	0.620 [*]	0.005	0.561 ^f	0.005
	H/L	0.148	0.003	0.130 ^b	0.004	0.128 ^b	0.003	0.148	0.003

Średnia – średnie wartości D/L oraz H/L dla pozycji sygnałów FISH badanych centromerów w 150 plemnikach; **SE** – błąd standardowy. Znaczące różnice pomiędzy wartościami oznaczone cyframi np. 0.100¹, odnoszą się do różnic między osobami. Natomiast wartości oznaczone literami np. 100¹, odnoszą się do różnic pomiędzy chromosomami. Dla porównania wyników zastosowano jednokierunkową analizę wariancji (one-way ANOVA) oraz test U Manna-Whitneya na poziomie istotności $\alpha = 0.05$ (wartość $p < 0.05$ uznawano za różnicę istotną statystycznie).

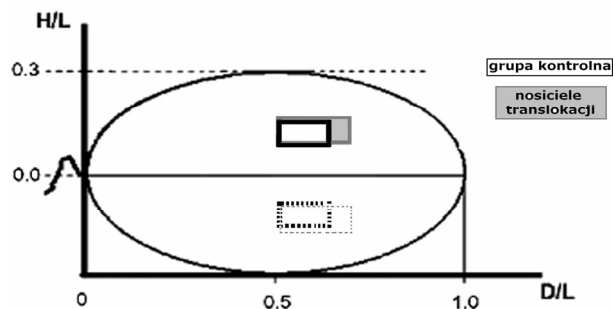
Wartości z ¹ były znacząco różne w porównaniu z resztą wyników w tej grupie
 Wartości z ² były znacząco różne w porównaniu z wynikami dla T5
 Wartości z ³ były znacząco różne w porównaniu z wynikami dla T1
 Wartości z ⁴ były znacząco różne w porównaniu z wynikami dla T3, T5 oraz T6
 Wartości z ⁵ były znacząco różne w porównaniu z wynikami dla T1 oraz T4
 Wartości z ⁶ były znacząco różne w porównaniu z wynikami dla T1, T4 oraz T5
 Wartości z ⁷ były znacząco różne w porównaniu z wynikami dla T3, T5 oraz T6
 Wartości z ⁸ były znacząco różne w porównaniu z wynikami dla T1 oraz T4
 Wartości z ⁹ były znacząco różne w porównaniu z wynikami dla chromosomów 7 oraz Y
 Wartości z ¹⁰ były znacząco różne w porównaniu z wynikami dla chromosomu 7
 Wartości z ^a były znacząco różne w porównaniu z wynikami dla chromosomu 9
 Wartości z ^b były znacząco różne w porównaniu z wynikami dla chromosomu X
 Wartości z ^c były znacząco różne w porównaniu z wynikami dla chromosomu X
 Wartości z ^d były znacząco różne w porównaniu z wynikami dla chromosomu X
 Wartości z ^e były znacząco różne w porównaniu z wynikami dla chromosomu X
 Wartości z ^f były znacząco różne w porównaniu z wynikami dla chromosomu X
 Wartości z ^g były znacząco różne w porównaniu z wynikami dla chromosomu X
 Wartości z ^h były znacząco różne w porównaniu z wynikami dla chromosomu X

Wartości z ¹ – różnice pomiędzy osobami dla poszczególnych chromosomów
 Wartości z ² – różnice pomiędzy osobami dla poszczególnych chromosomów
 Wartości z ³ – różnice pomiędzy osobami dla poszczególnych chromosomów
 Wartości z ⁴ – różnice pomiędzy osobami dla poszczególnych chromosomów
 Wartości z ⁵ – różnice pomiędzy osobami dla poszczególnych chromosomów
 Wartości z ⁶ – różnice pomiędzy osobami dla poszczególnych chromosomów
 Wartości z ⁷ – różnice pomiędzy osobami dla poszczególnych chromosomów
 Wartości z ⁸ – różnice pomiędzy osobami dla poszczególnych chromosomów
 Wartości z ⁹ – różnice pomiędzy osobami dla poszczególnych chromosomów
 Wartości z ¹⁰ – różnice pomiędzy osobami dla poszczególnych chromosomów
 Wartości z ^a – różnice pomiędzy osobami dla poszczególnych chromosomów
 Wartości z ^b – różnice pomiędzy osobami dla poszczególnych chromosomów
 Wartości z ^c – różnice pomiędzy osobami dla poszczególnych chromosomów
 Wartości z ^d – różnice pomiędzy osobami dla poszczególnych chromosomów
 Wartości z ^e – różnice pomiędzy osobami dla poszczególnych chromosomów
 Wartości z ^f – różnice pomiędzy osobami dla poszczególnych chromosomów
 Wartości z ^g – różnice pomiędzy osobami dla poszczególnych chromosomów
 Wartości z ^h – różnice pomiędzy osobami dla poszczególnych chromosomów



Ryc. 19. Lokalizacja radialna centromerów chromosomów 7, 9, X i Y w jądrach komórek plemników mężczyzn z grupy kontrolnej (K1-K4, i wartość średnia K) oraz nosicieli translokacji (T1-T6). Schemat przedstawia jeden ze sposobów wizualizacji lokalizacji radialnej centromerów. Geometryczne parametry jądra plemnika: H, D, L wg ryciny 6. Wartości H/L oraz D/L przedstawiono w tabelach 25. i 26. Kółkami oznaczono wyniki istotnie różne w porównaniu z wartością średnią K.

Fig. 19. Radial localization of the centromere of chromosomes 7, 9, X and Y in sperm cells nuclei of men from the control group (K1-K4, and mean value K) and the carriers of translocations (T1-T6). The scheme shows one of the ways of visualizing a radial localization of centromeres. The geometric parameters of sperm nucleus: H, D, L according to Fig. 6. H/L and D/L values are shown in tables 25 i 26. Considerable differences from the mean value K are circled.



Ryc. 20. Porównanie lokalizacji radialnej centromerów chromosomów 7 (lub der7), 9 (lub der9), X oraz Y w grupie kontrolnej (jasny prostokąt) oraz u nosicieli translokacji (szary prostokąt). Każdy z prostokątów ilustruje fragment chromocentru (wraz z lustrzanym odbiciem po drugiej stronie osi podłużnej), w którym zlokalizowano wszystkie badane centromery u wszystkich osób z danej grupy (Geometryczne parametry jądra plemnika wg ryciny 6., wartości H/L i D/L z tabel 25. oraz 26.).

Fig. 20. Comparison of the radial localization of centromeres of chromosomes 7 (or der7), 9 (or der9), X & Y in the control group (the white rectangular) and in translocation carriers (the grey rectangular). Each rectangular illustrates a fragment of the chromocenter area (together with the mirror reflection at the side of the oblong axis), in which all the studied centromeres were localized (The geometric parameters of sperm nucleus according to Fig. 6, H/L i D/L values from tables 25 and 26).

4.2.3. Plemniki mężczyzn z niepowodzeniami rozrodu

Wewnątrzjądrową radialną lokalizację centromerów chromosomów 15, 18, X i Y określano w plemnikach pięciu pacjentów z niepowodzeniami rozrodu (P1–P5) [283]. Wartości D/L oraz H/L (wg ryciny 6A) obliczone dla indywidualnych pacjentów P1–P5 przedstawiono w tabeli 31. Wyniki dla poszczególnych pacjentów porównano zarówno ze średnimi P dla całej grupy, jak i ze średnimi K obliczonymi dla grupy kontrolnej (dane z tabeli 29.). Średnie wartości P dla chromosomów 15, 18 oraz X różniły się istotnie od średnich K. W przypadku indywidualnych wyników dla chromosomu 15 u wszystkich pacjentów stwierdzono różnice w porównaniu ze średnimi K. W przypadku chromosomu 18 wyniki dla P5 różniły się od średniej K, dla chromosomu X wyniki dla P1, P2 i P5 różniły się od średniej K, a dla chromosomu Y wyniki P1 i P4 różniły się od średniej K.

Ilustracją danych z tabeli 29. oraz z tabeli 31. dotyczących indywidualnych różnic w radialnej lokalizacji centromerów badanych chromosomów w grupie kontro-

lnej (K1–K4) oraz w grupie pacjentów (P1–P5) stanowi rycina 21. Dodatkową ilustracją danych z tabeli 29. i tabeli 31., dotyczącą porównania tylko wartości średnich P oraz K stanowi rycina 22. Największą różnicę w porównaniu z kontrolą stwierdzono w przypadku średniej P dla centromeru chromosomu 15.

Natomiast na rycinie 23. porównano schematyczne obszary wewnątrz jądra komórkowego plemnika, w których zlokalizowano wszystkie badane centromery (chromosomów 15, 18, X i Y) w grupie kontrolnej (K1–K4) oraz w grupie pacjentów (P1–P5) (schemat wg ryciny 6B, wartości D/L i H/L z tabeli 29. i tabeli 31.). W obydwóch porównywanych grupach centromery zlokalizowane były na stosunkowo niewielkim obszarze, stanowiącym potencjalnie fragment chromocentrum. Wielkość i położenie tego obszaru u pacjentów różniły się statystycznie w porównaniu z grupą kontrolną (rycina 23., tabela 31.), choć w mniejszym stopniu niż różnice obserwowane u nosicieli translokacji (rycina 20.).

Tab. 31. Lokalizacja radialna centromerów chromosomów 15, 18, X oraz Y w plemnikach mężczyzn z niepowodzeniami rozrodu (P1–P5) oraz porównanie z wartością średnią K obliczoną dla grupy kontrolnej (K1–K4) (dane z tabeli 29.). Inne dane o P1–P5: patrz tabele 25. i 26. Parametry D/L oraz H/L: wg schematu na rycinie 6.

Tab. 31. Radial centromere localization of chromosomes 15, 18, X & Y within sperm cells of men with reproductive failures (P1–P5) and its comparison with mean value K calculated, for the control group (K1–K4) (the data in table 29). The other data about P1–P5: see tables 25 & 26. The D/L & H/L parameters: as in the scheme in Fig. 6.

Chromosom		15		18		X		Y	
P = niepowodzenia rozrodu		Średnia	SE	Średnia	SE	Średnia	SE	Średnia	SE
P1	D/L	nie badano		nie badano		0.625 ^{3d}	0.005	0.533 ^{P5}	0.009
	H/L	nie badano		nie badano		0.167 ^{▼P4}	0.007	0.169 ^{▼P}	0.006
P2	D/L	nie badano		nie badano		0.581 [▼]	0.010	0.568	0.007
	H/L	nie badano		nie badano		0.138	0.006	0.134	0.005
P3	D/L	0.532	0.011	0.532	0.007	nie badano		nie badano	
	H/L	0.122 ^{▼b}	0.006	0.157 ²	0.006	nie badano		nie badano	
P4	D/L	0.627 ^{▼1}	0.012	0.518 [*]	0.010	0.618	0.010	0.613 ^{▼P1}	0.007
	H/L	0.096 ^{▼*}	0.006	0.151	0.008	0.135	0.007	0.152	0.008
P5	D/L	0.506 ^{▼P}	0.008	0.530	0.007	0.575 ^{▼ab}	0.008	0.546 ^a	0.008
	H/L	0.119	0.007	0.125 [▼]	0.008	0.098 ^{▼P1}	0.005	0.122	0.005
Średnia P	D/L	0.554	0.006	0.527	0.005	0.600 [▼]	0.004	0.566	0.004
	H/L	0.113 [▼]	0.004	0.145 [▼]	0.004	0.134	0.003	0.143	0.003
Średnia K	D/L	0.540	0.005	0.538	0.006	0.620 [*]	0.005	0.561 ^{ab}	0.005
	H/L	0.156	0.004	0.165	0.004	0.128 ^b	0.003	0.148	0.003

Średnia – średnie wartości D/L oraz H/L dla pozycji sygnałów FISH badanych centromerów w 150 plemnikach; SE – błąd standardowy. Znaczące różnice pomiędzy wartościami oznaczone cyframi np. 0.100¹, odnoszą się do różnic pomiędzy osobami. Natomiast wartości oznaczone literami np. 100^c, odnoszą się do różnic między chromosomami. Dla porównania wyników zastosowano jednokierunkową analizę wariancji

(one-way ANOVA) oraz test U Manna-Whitneya na poziomie istotności $\alpha = 0,05$ (wartość $p < 0,05$ uznawano za różnicę istotną statystycznie).

Wartości z [▼] były znacząco różne w porównaniu z wartością średnią K

Wartości z ^P były znacząco różne w porównaniu z wartością średnią P

Wartości z ¹ były znacząco różne w porównaniu z resztą wyników w tej grupie

Wartość z ² była znacząco różna w porównaniu z wynikiem dla P5

Wartość z ³ była znacząco różna w porównaniu z wynikami dla P2 i P5

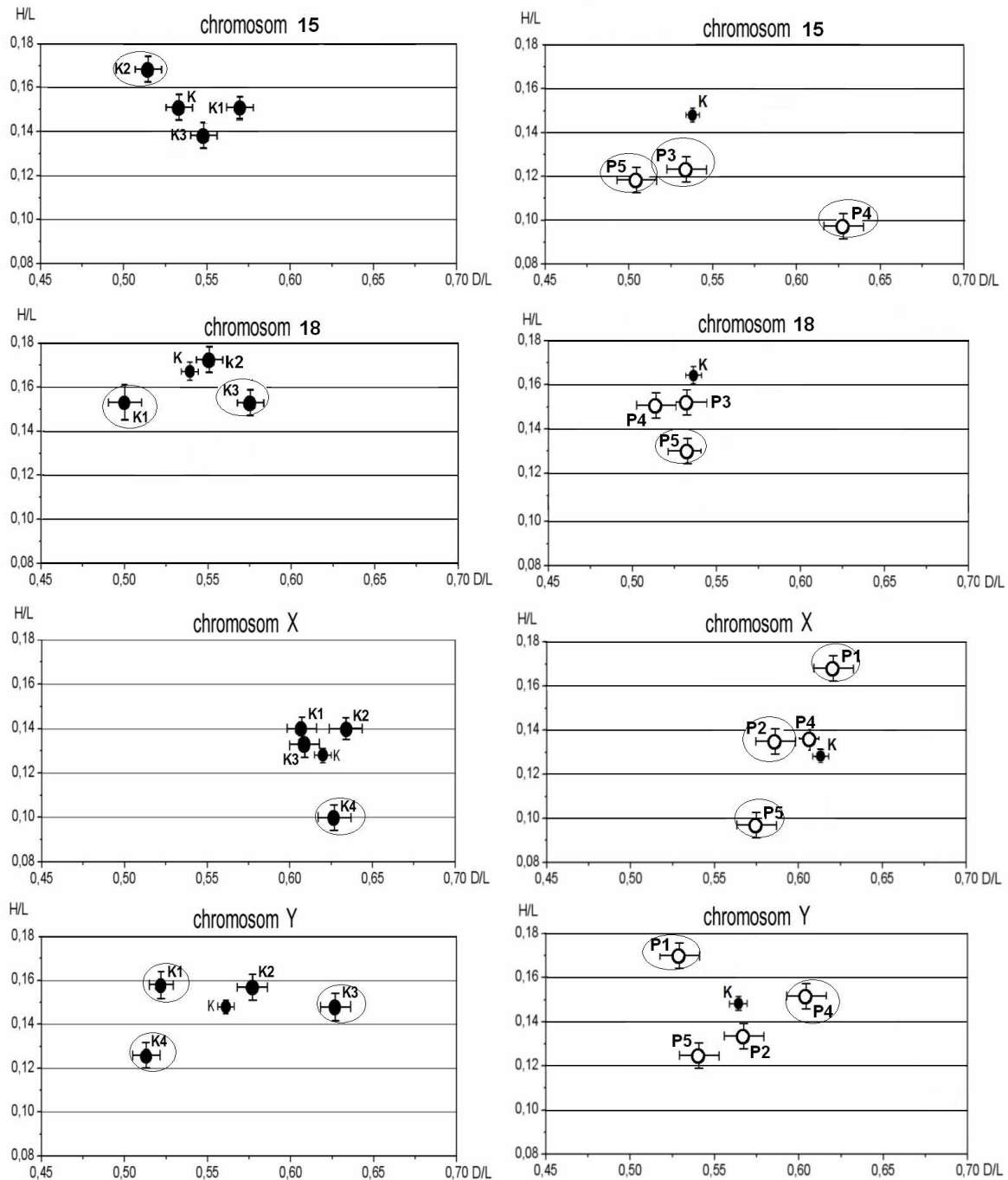
Wartość z ⁴ była znacząco różna w porównaniu z wynikiem dla P4

Wartość z ⁵ była znacząco różna w porównaniu z wynikiem dla P2

różnice pomiędzy osobami dla poszczególnych chromosomów

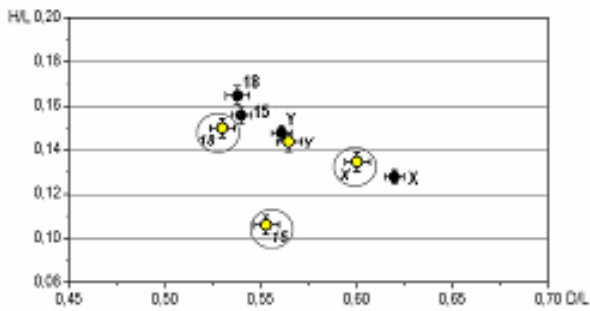
Wartości z^{*} były znacząco różne w porównaniu z wynikami dla pozostałych chromosomów
 Wartości z^a były znacząco różne w porównaniu z wynikami dla chromosomu 15
 Wartości z^b były znacząco różne w porównaniu z wynikami dla chromosomu 18
 Wartości z^c były znacząco różne w porównaniu z wynikami dla chromosomu X
 Wartości z^d były znacząco różne w porównaniu z wynikami dla chromosomu Y

} różnice pomiędzy chromosomami



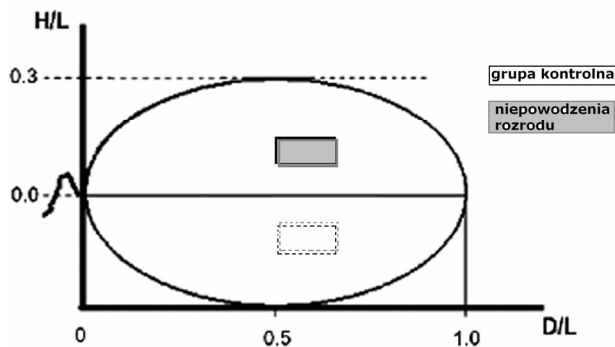
Ryc. 21. Lokalizacja radialna centromerów chromosomów 15, 18, X i Y w jądrach komórkowych plemników mężczyzn z grupy kontrolnej (K1-K4, i wartość Średnia K) oraz mężczyzn z niepowodzeniami rozrodczymi (P1-P5). Geometryczne parametry jądra plemnika: H, D, L wg ryciny 6. Schemat ilustrujący sposób wizualizacji lokalizacji radialnej centromerów wg [92]. Wartości H/L oraz D/L przedstawiono w tabelach 29. i 31. Kółkami oznaczono wyniki istotnie różne w porównaniu z wartością Średnią K.

Fig. 21. Radial centromere localization of chromosomes 15, 18, X & Y sperm cells nuclei of the men from control group (K1-K4, and mean value K) and the men with reproductive failures (P1-P5). The geometric parameters: H, D, L according to Fig. 6. The scheme illustrating the radial localization of centromeres according to [92]. H/L and D/L values were presented in tables 29 i 31. Considerable differences from the mean value K are circled.



Ryc. 22. Porównanie wewnątrzjądrowej radialnej lokalizacji centromerów chromosomów 15, 18, X oraz Y w plemnikach mężczyzn z grupy kontrolnej (K) (czarne kropki) oraz pacjentów z niepowodzeniami rozrodu (P) (jasne kropki). Pozycje czarnych i jasnych kropek wyznaczono na podstawie wartości średnich K oraz P z tabeli 30. (parametry D/L i H/L wg ryciny 6).

Fig. 22. Comparison of the radial localization of centromeres of chromosomes 15, 18, X and Y in sperm cells of men from the control group (K) (the black spots) and in the patients with reproductive failure (P) (the bright spots). The positions of black and bright spots were determined on the basis of mean values K and P in table 30 (the D/L i H/L parameters according to Fig. 6).



Ryc. 23. Porównanie lokalizacji radialnej centromerów chromosomów 15, 18, X oraz Y w grupie kontrolnej (K) (jasny prostokąt) oraz w grupie pacjentów z niepowodzeniami rozrodu (P) (szary prostokąt). Każdy z prostokątów ilustruje fragment chromocentrum (wraz z lustrzanym odbiciem po drugiej stronie osi podłużnej), w którym zlokalizowano wszystkie badane centromery u wszystkich badanych osób z danej grupy (geometryczne parametry plemnika wg ryciny 6., wartości H/L i D/L z tabel 29. i 31.).

Fig. 23. Comparison of the radial centromeres localization of chromosomes 15, 18, X & Y in control group (K) (the bright rectangular) and in the group of patients with reproductive failures (P) (the gray rectangular). Each rectangular illustrates a fragment of the chromocenter area, in which all the examined centromeres in all subjects from a given group were localized (the parameters of the sperm according to Fig.6. The H/L and D/L values from tables 29 i 31).

4.2.4. Międzyosobnicze różnice w radialnej lokalizacji centromerów

W tabeli 32. przedstawiono podsumowanie danych dotyczących radialnej lokalizacji centromerów wybranych chromosomów wskazujące na występowanie istotnych statystycznie różnic w indywidualnych wynikach

(w tabeli 32. brak różnic określono znakiem ‘minus’, różnice określono znakiem ‘plus’) (na podstawie wyników z tabel 29–31 oraz rycin 19. i 20.). Z tego zestawienia wynika, iż międzyosobnicze różnice w lokalizacji centromeru danego chromosomu w obrębie chromocentrum występują nawet w grupie kontrolnej (K1-K4), choć w różnym stopniu dotyczą różnych chromosomów. Topologia centromeru chromosomu 7 w chromocentrum plemników u wszystkich mężczyzn z grupy kontrolnej była identyczna, to znaczy bez statystycznie istotnych różnic międzyosobniczych. Natomiast w przypadku topologii centromeru chromosomu Y odwrotnie: większość mężczyzn (K1-K4) wykazywała znaczące różnice międzyosobnicze w porównaniu z grupą kontrolną, międzyosobnicze różnice w topologii centromerów w chromocentrum plemników u nosicieli translokacji (T1-T6) oraz mężczyzn z niepowodzeniami rozrodu (P1-P5) były niemal regułą i dotyczyły wszystkich badanych chromosomów (w tabeli 32. procent wszystkich ‘plusów’ w grupie kontrolnej, w grupie nosicieli translokacji oraz w grupie z niepowodzeniami rozrodu wynosił odpowiednio 38%, 75% i 64%).

Tab. 32. Międzyosobnicze znaczące różnice w radialnej lokalizacji centromerów chromosomów 7, 9, 15, 18, X oraz Y w plemnikach mężczyzn z grupy kontrolnej (K1-K4), nosicieli translokacji (T1-T6) oraz grupy (P1-P5) = podsumowanie danych przedstawionych na rycinach 19. i 21. (na podstawie wartości z tabel 29., 30. i 31.) (“+” oznacza statystycznie istotną różnicę, “-” oznacza brak takiej różnicy)

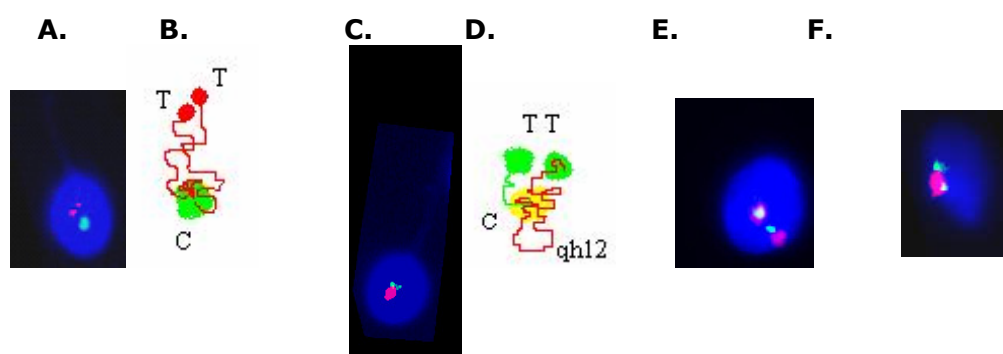
Tab. 32. Significant interindividual differences in radial centromere localization of chromosomes 7, 9, 15, 18, X and Y in sperm nuclei of men from control group (K1-K4), carriers of translocations (T1-T6) and (P1-P5) group = the summary of the data presented in Fig. 19 & 21 (on the basis of the values in tables 29, 30 & 31) (“+” means significant difference, “-” means the lack of difference)

	Różnice w porównaniu do średniej wartości K					
chromosom	7	9	15	18	X	Y
K1	-	+	-	+	-	+
K2	-	-	+	-	-	-
K3	-	-	-	+	-	+
K4	-	-	-	-	+	+
T1 t(1;7)	+	-	-	-	-	+
T2 t(2;7)	+	-	-	-	-	-
T3 t(7;13)	+	-	-	-	+	+
T4 t(7;9)	-	+	-	-	+	+
T5 t(9;14)	-	+	-	-	+	-
T6 t(4;13)	-	-	-	-	-	+
P1	-	-	-	-	+	+
P2	-	-	-	-	+	-
P3	-	-	+	-	-	-
P4	-	-	+	-	-	+
P5	-	-	+	+	+	-

4.2.5. Wzajemna lokalizacja regionów subtelerowych ramion p i q chromosomów X oraz Y

Dla chromosomów X oraz Y wykonano badania metodą FISH (w 100 jądrach komórkowych plemników płodnego mężczyzny) dotyczące położenia względem siebie regionów subtelerowych (ramion p oraz q tego samego chromosomu). W przypadku chromosomu X stosowano sondę centromerową i dwie sondy subtelerowe. W przypadku chromosomu Y dla uwidocznienia

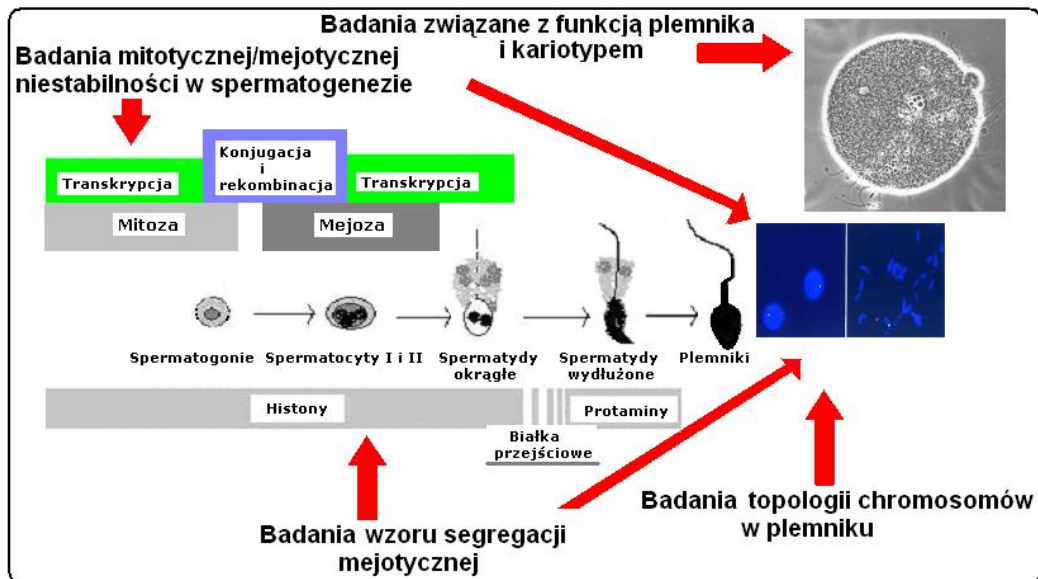
wzajemnej lokalizacji subtelerów ramion p oraz q, oprócz odpowiednich sond subtelerowych, zastosowano sondę znakującą region qh12 (spis sond w tabeli 3.). Ilustrujące te badania, przykładowe zdjęcia plemników z sygnałami zastosowanych sond, przedstawiono na rycinie 24. Stwierdzono, że sygnały FISH sond subtelerowych ramion p i q chromosomu X są zlokalizowane bardzo blisko siebie w 78% plemników (rycina 24A), natomiast chromosomu Y w 69% plemników (rycina 24C).



Ryc. 24. Lokalizacja centromeru i regionów subtelerowych (ramion p oraz q) w plemniku (A oraz B dotyczą chromosomu X, natomiast C – F chromosomu Y). A. Identyfikacja metodą FISH regionów subtelerowych (sonda czerwona) oraz centromeru (sonda zielona) chromosomu X w plemniku. B. Schemat (na podstawie zdjęcia A) ilustrujący przypuszczalną wzajemną lokalizację telomerów (T) oraz centromeru (C) chromosomu X w plemniku na zdjęciu A. C. Identyfikacja metodą FISH regionów subtelerowych ramion p i q (sonda zielona) oraz regionu chromosomu Yqh12 (sonda czerwona) w plemniku. D. Schemat (na podstawie zdjęcia C) ilustrujący przypuszczalną wzajemną lokalizację telomerów (T) oraz centromeru (C – kolor żółty) chromosomu Y w plemniku na zdjęciu C. E. Identyfikacja metodą FISH dwóch chromosomów Y w plemniku (hiperhaploidia chromosomu Y) (analogicznie do zdjęcia C: obydwa regiony subtelerowe – sonda zielona, region qh12 – sonda czerwona). Prawdopodobnie w obydwóch chromosomach Y telomery ramion p i q zlokalizowane są obok siebie (wg schematu D), stąd sondy subtelerowe ramion p i q dają jeden wspólny zielony sygnał. F. Przykład plemnikowego chromosomu Y, w którym regiony subtelerowe ramion p oraz q nie są do siebie zbliżone (metoda FISH, sonda zielona – subteleromy p i q; sonda czerwona - region qh12 chromosomu Y) (spis sond w tabeli 3.).

Fig. 24. Localization of the centromere and the subteleric regions (p and q) in the sperm cell (A and B concern chromosome X, C – F concern chromosome Y). A. FISH identification of subteleric regions (red probe) and the centromere (green probe) of chromosome X in sperm cell. B. The scheme, produced on the basis of picture A, illustrating an estimated mutual localization of telomeres (T) and the centromere (C) of the chromosome X in the sperm cell in the picture A. C. FISH identification of the subteleric regions of arm p i q (green probe) and chromosom Yqh12 (red probe) in the sperm cell. D. The scheme, produced on the basis of the picture, illustrating the estimated mutual position of telomeres (T) and the centromere (C – yellow) of the chromosome Y in sperm cell in the picture C. E. FISH identification of two chromosomes Y in the sperm cell (hyperhaploidy of the chromosome Y) (analogically to the picture C: both subteleric regions – green probe, the region qh12 – red probe). Probably, the telomeres of arms p and q are located next to each other in both chromosomes Y (according to the scheme D), hence the subteleric probes of arms p and q produce a common green signal. F. Example of a sperm chromosome Y in which subteleric regions of arms p and q are not closed to each other (FISH method, the green probe – subtelerome p i q; red probe - the qh12 region of chromosome Y) (the list of probes in table 3).

V. DYSKUSJA



Ryc. 25. Ilustracja „topologii” czterech zagadnień badanych w pracy na tle zmodyfikowanego schematu spermatogenezy wg [325]. Zdjęcia przedstawiają spenetrowany oocyt chemiczny (patrz objaśnienia przy rycinie 2.) oraz sygnały FISH w jądrze komórkowym plemnika i na chromosomach plemnika (patrz objaśnienia przy rycinie 10B i C).

Fig. 25. Illustration of the "topology" of the four issues studied in the monography against a modified scheme of spermatogenesis according to [333]. The pictures show a penetrated hamster oocyte (see the descriptions for Fig. 2) and FISH signals in sperm nucleus and on sperm chromosome complements (see the description for Fig. 10B & C).

Na rycinie 25. zilustrowano ogólną koncepcję, którą przyjęto podejmując badania. Głównym „bohaterem” badań były chromosomy plemnika. Eufemizując można powiedzieć, że plemnik swoje chromosomy „chowa i otacza tajemnicą”, którą nie jest łatwo zgłębić. Chromosomy plemnika są końcowym produktem mejozy zatem analiza aberracji tych chromosomów dostarcza przede wszystkim informacji o błędach, które uniknęły wyeliminowania w trakcie mejozy. U mężczyzn z różnego typu niepowodzeniami rozrodu średnia częstość aberracji jest istotnie wyższa niż u płodnych mężczyzn stąd uważa się, że np. podwyższona częstość aneuploidii w plemnikach może być jednym z wykładników zaburzonego procesu spermatogenezy. W rozdziale IV.2.1. ('Analiza występowania aneuploidii w plemnikach i limfocytach') badano wybrane aspekty mitotycznej/mejotycznej niestabilności w spermatogenezie. W tych badaniach poszukiwano ewentualnych asocjacji pomiędzy poziomem aneuploidii chromosomów w jądrach komórek somatycznych w interfazie a poziomem aneuploidii chromosomów w plemnikach. Choć zjawisku podwyższonej częstości aneuploidii chromosomów plemnikowych przypisuje się dużą rolę w etiologii niepowodzeń rozrodu, to jednocześnie z samego tego faktu wyciąganie jednoznacznych wniosków diagnostycznych jest nie do końca wiarygodne. Trudno jest bowiem zaobserwować proste korelacje pomiędzy kariotypem pojedynczego plemnika a jego morfologią i/lub ruchliwością, a w konsekwencji także między częstością i rodzajem aberracji chromosomów

plemnikowych a określonym typem niepłodności. W rozdziale IV.2.1.1. ('Chromosomy plemników barwione metodą GTG') przedstawiono przykłady takiej właśnie sytuacji: podobnie wysoką częstość aberracji chromosomów stwierdzano w plemnikach o prawidłowych cechach bez bezpośredniego związku z kariotypem somatycznym pacjentów. Jednocześnie plemniki te miały zachowaną zdolność penetracji *in vitro* oocytów chemicznych w teście SPA (tabela 5., pacjenci Nr 4, 29 i 39). Wydaje się, że na etapie penetracji oocytu również nie ma jednoznacznej korelacji wyników ani wobec selekcji plemników z aberracjami chromosomowymi, ani z określonym parametrem nasienia. Rezultaty badań dotyczących związku funkcji plemnika i kariotypu przedstawiono w rozdziale IV.1. ('Wyniki testu penetracji i analizy kariotypów somatycznych'). W doświadczeniach tych oceniano testem SPA zdolność plemników do penetracji *in vitro* oocytów chemicznych w powiązaniu z kariotypem somatycznym oraz podstawowymi parametrami nasienia. Konsekwencją braku prezygotycznej selekcji plemników z aberracjami chromosomowymi są typowe dla nosicieli translokacji (TCW) niepowodzenia rozrodu polegające na eliminacji, nawet na najwcześniejszych etapach rozwoju, niezrównoważonych genetycznie zarodków. W rozdziale IV.3. ('Wzory segregacji mejotycznej u nosicieli translokacji chromosomowych wzajemnych') opisano wzory segregacji chromosomów plemnikowych u nosicieli kilku niebadanych wcześniej pod tym kątem translokacji oraz sprawdzano, jaki jest związek pomiędzy wzorem se-

gregacji a prognozą niepowodzeń rozrodu ocenianą na podstawie danych z rodowodu. Porównano także wzory segregacji mejozytycznej u nosicieli tej samej translokacji rodzinnej oraz, w jednym przypadku, z wynikami diagnostyki przedimplantacyjnej. Opisano także segregację mejozytyczną chromosomu markerowego w przypadku kariotypu 46,XY[96]/47,XY,+mar[4].fish der20 (Rozdział IV.2.2.).

Chromosomy plemnika zajmują prawdopodobnie nieprzypadkową, określoną pozycję w architekturze wewnątrzjądrowej plemnika. Spekuluje się, że specyficzna architektura wewnątrzjądrowa plemnika odgrywa istotną rolę w prawidłowym kształtowaniu się przedjądra męskiego, a w konsekwencji, w prawidłowym rozwoju zygoty. W kontekście tych sugestii interesujące wydawało się podjęcie badań przedstawionych w rozdziale IV.4. ('Wyniki analizy topologii chromosomów w jądrze komórkowym plemnika'). Przedmiotem tych badań była analiza wpływu nieprawidłowej spermatogenezy (typowej dla nosicieli translokacji chromosomowych wzajemnych lub objawiającej się wysokim poziomem aneuploidii) na pozycję centromerów wybranych chromosomów plemnikowych w chromocentrum. Ponadto, na rycinie 24E (rozdział IV.4.2.5.) przedstawiono zdjęcie jądra komórkowego plemnika, na którym pokazano, że chromatyda w obrębie terytorium chromosomu Y może przyjmować konfigurację „wsuwki do włósów”. Ilustrację tę można by zatytułować jako „brakujący chromosom”, bowiem dane literaturowe dotyczyły w tej kwestii tylko dużych chromosomów [10].

1. Badanie potencjalnej zdolności plemników do zapłodnienia w powiązaniu z kariotypem somatycznym oraz podstawowymi parametrami nasienia

Stosunkowo liczne dane literaturowe dostarczyły informacji o częstości występowania aberracji chromosomowych w limfocytach krwi obwodowej u mężczyzn z niepowodzeniami rozrodu (rozdział I.2.). Większość tych badań dotyczyła pacjentów z nieprawidłowymi parametrami ejakulatu, jedynie nieliczne pacjentów z normozoospermią [112, 114, 115, 326]. Podawane przez różnych autorów wyniki dotyczące częstości występowania określonych rodzajów aberracji chromosomowych wykazują różnice, co prawdopodobnie wynika z różnej liczebności badanych grup i faktu, że część danych dotyczyła nieselekcjonowanych grup pacjentów. Pomimo pewnych rozbieżności, badania te dostarczyły ważnych informacji wskazujących na związku pomiędzy genezą męskiej niepłodności a aberracjami chromosomowymi [4, 111]. W większości tych prac analiza ograniczała się tylko do badania kariotypów somatycznych i analizy seminologicznej. Z kolei w pracach, w których oceniano własności plemników za pomocą jednego z testów funkcjonalnych, wyniki korelowano przede wszystkim z cechami ejakulatu a nie z wynikami kariotypowania [327, 328]. W przedstawionych niniejszych badaniach (Rozdział IV.1.) sprawdzano, czy można zaobserwować ewentualne korelacje pomiędzy kariotypem somatycznym a „potencjalną zdolnością plemników do

zapłodnienia” ocenianą *in vitro* testem funkcjonalnym SPA, w powiązaniu z podstawowymi parametrami nasienia. W związku z tym, badaniami objęto zarówno pacjentów z normozoospermią (I) (tabele 5. i 6.), jak i z zaburzeniami spermatogenezy (O;A;T) (tabele 8. i 10.). Trzeba zaznaczyć, że w przypadku pierwszej grupy (pary małżeńskie z tzw. niepłodnością idiopatyczną) można było jedynie domniemywać męską niepłodność, natomiast mężczyźni ci nie spełniali w sposób jednoznaczny kryterium „męskiej niepłodności idiopatycznej”, bowiem ich partnerki nie podejmowały wcześniej prób zajścia w ciążę (a tym samym nie miały dzieci) z innymi partnerami.

Choć stwierdzenie, że test SPA ocenia „potencjalną zdolność” plemników do zapłodnienia *in vitro* jest określeniem umownym wydaje się, że dla założonych celów badawczych test ten spełniał swoje zadanie. Prawidłowo wykonywany test SPA pozwala ocenić zdolność plemników do kapacytacji, reakcji akrosomowej, fuzji z oolemmą, penetracji ooplazmy i dekondensacji własnego DNA [329]. Ograniczeniem tego testu jest fakt, iż wykonywany jest na oocytach (chomiczych) pozbawionych enzymatycznie osłonki przejrzystej (celem usunięcia bariery międzygankowej), co stanowi znaczne „ułatwienie” dla wykonywania funkcji przez plemnik. Najistotniejszą zaletą testu SPA (przynajmniej z punktu widzenia badań genetycznych) jest możliwość obserwacji kształtowania się męskich przedjądrzy. Natomiast z punktu widzenia praktyki klinicznej, wartość prognostyczna testu SPA w stosunku do faktycznych sukcesów reprodukcyjnych (ciąż spontanicznych lub wyniku zapłodnień IVF i/lub ICSI) jest dyskusyjna: w licznych publikacjach dotyczących takiego porównania autorzy uzyskiwali zarówno pozytywną, jak i słabą korelację [328, 330, 331, 332]. Na pewno jedną z przyczyn tych rozbieżności był brak standaryzacji testu. W konsekwencji, część nieprawidłowych wyników testów SPA była rezultatem zbyt krótkiej kapacytacji i/lub zbyt małej (poniżej 0,5 mln/ml buforu) koncentracji plemników [190]. Przeważa opinia, że w praktyce klinicznej test SPA może być użyteczny przede wszystkim w rozróżnianiu pomiędzy parami z wysokim prawdopodobieństwem uzyskania ciąży w wyniku zapłodnienia IVF a bardzo niskim prawdopodobieństwem, kiedy to od razu wskazana byłaby metoda ICSI [333]. Wynika to z obserwacji, że przy prawidłowo wykonywanym teście SPA odsetek fałszywie negatywnych wyników jest bardzo mały (< 0,03% wg [334]). Spośród pacjentów, dla których w niniejszych badaniach wykonywano test SPA (tabele 5. i 8.), udało się uzyskać informację o wynikach zapłodnień *in vitro* jedynie od niewielkiej grupy (34 pary/164 pary, dla których wykonano test SPA). Zestawienie tych danych (tabela 12.) potwierdziło sugestie innych autorów, że odsetek fałszywie negatywnych wyników (2,9%) był w tym teście istotnie mniejszy w porównaniu do wyników fałszywie pozytywnych (około 30%). Dotyczyło to zarówno pacjentów z normozoospermią (I), jak i z obniżonymi cechami ejakulatu (O;A;T).

Z zestawienia danych dotyczących testu SPA i kariotypów somatycznych (tabela 33.) wynika, że w obu grupach pacjentów (I oraz O;A;T) odsetek kariotypów 46,XY był podobny (odpowiednio 71% i 74%). Jednocześnie niemal o połowę więcej pacjentów z O;A;T wykazywało upośledzoną funkcję penetracyjną plemników (jednocześnie negatywny wynik testu SPA) w stosunku do grupy I (odpowiednio 31% i 17%). Mimo iż podgrupy pacjentów z określoną wadą plemników były różnej liczebności i/lub mało liczne (tabele 8., 9. i 10.) można powiedzieć, że u pacjentów O;A;T z kariotypem 46,XY (tzn. bez jakiegokolwiek anomalii kariotypu) nie zauważono bezpośredniego związku pomiędzy wynikiem testu SPA a określoną wadą plemników.

We wcześniejszych doniesieniach literaturowych u pacjentów z O;A;T (bez badania kariotypów) często opisywano korelację pomiędzy potencjalną zdolnością do prokreacji a koncentracją [173, 335], ruchliwością [173, 336] lub normalną/nieprawidłową morfologią plemników [337]. Bardziej szczegółowe analizy wskazywały na korelacje pomiędzy dobrą morfologią plemników a zdolnością do wiązania się z osłonką przejrzystą oocytów oraz pomiędzy ruchliwością plemników a zdolnością penetracji do oocytu [338].

z grupą I (tabela 33.). Zestawiając te wyniki trzeba jednak uwzględnić istotnie mniejszą liczebność analizowanych przypadków w porównaniu z meta-analizą. Poza tym, dane literaturowe są niejednorodne w tym sensie, że większość autorów jako kariotypy 46,XY opisuje również warianty (heteromorfizmy) oraz niskoprocentowy (< 10%) mozaicyzm dotyczący liczby chromosomów lub chromosomów markerowych. Wynika to między innymi z faktu, że wykrycie niskoprocentowego mozaicyzmu wymaga analizowania 50 zamiast rutynowo analizowanych 20 płytek metafazowych [344]. Ponadto, szczególnie w przypadku chromosomu markerowego, wymaga to pewnego wyczulenia osoby analizującej preparaty. Być może właśnie z tych względów odsetek pacjentów (12%), u których wykrywano chromosomy markerowe był dużo wyższy, niżby należało oczekiwać na podstawie danych literaturowych (patrz rozdział I.6.4.) [326]. Jednocześnie, z danych literaturowych wiadomo, że wpływ chromosomów markerowych na niepłodność nie jest jednoznacznie określony (rozdział I.6.4). Tym trudniej doszukiwać się związku z niepowodzeniami rozrodu u nosicieli chromosomów markerowych występujących w niewielkim tylko odsetku komórek somatycznych (tabela 5.). Na podstawie uzyskanych wyników można jedynie stwierdzić, że obecność chromosomów markero-

Tab. 33. Zestawienie wyników testu penetracji plemników (SPA) i analizy chromosomów w dwóch grupach pacjentów: z normozoospermią (I) oraz z (O;A;T)

Tab. 33. Comparison of the results of (SPA) assay and of the karyotyping in two groups of patients with normozoospermia (I) and with (O;A;T)

Kariotyp	Typ * niepłodności		Średnia SPA (%)		Wyniki SPA			
	I	O;A;T	I	O;A;T	Pozytywny > 30%		Negatywny ≤ 20%	
46,XY	71%	74%	45 ± 23	34 ± 21	70%	49%	17%	31%
heteromorfizmy	9%	24%	37 ± 15	28 ± 18	50%	37%	17%	26%
aberracje struktury	6%	2.5%	29 ± 14	26 ± 6	50%	50%	50%	50%
chromosomy markerowe	12%	-	53 ± 20	-	88%	-	0%	-
aberracje liczby chromosomów	3%	-	34 ± 6	-	50%	-	0%	-

*typ niepłodności (I): mężczyźni z par małżeńskich z niepłodnością idiopatyczną (tabela 6.); (O;A;T): mężczyźni z nieprawidłowymi parametrami ejakulatu (tabela 10.)

** dane dotyczą tylko pacjentów, dla których wykonano zarówno test SPA, jak i badanie kariotypu

Z licznych prac wynikało, że u pacjentów z O;A;T spośród podstawowych parametrów ejakulatu morfologia zdaje się być najlepszym indykatoem funkcji plemnika [310, 327, 339, 340]. Jednak późniejsze badania raczej tego nie potwierdziły [341, 342]. Biorąc pod uwagę zarówno dane literaturowe, jak i uzyskane wyniki własne uwzględniające badanie kariotypów (tabele 8., 9. i 10.) można stwierdzić, że w przypadku niepłodnych mężczyzn ani kariotyp 46,XY (tzn. bez jakichkolwiek anomalii lub/i heteromorfizmów) ani określona wada nasienia nie odzwierciedlają jednoznacznie funkcjonalnych kompetencji plemnika [343].

Na podstawie informacji z meta-analizy [110] należałoby oczekiwać, że w grupie pacjentów O;A;T odsetek pacjentów z kariotypem 46,XY będzie niższy w porównaniu

wych w żadnym przypadku nie upośledzała zdolności plemników do penetracji oocytów *in vitro* (tabele 5. i 6.). Jednocześnie zwraca uwagę nielatwy do wyjaśnienia faktu, iż tak często (12%) przypadki z niskoprocentowym mozaicyzmem chromosomów markerowych wykrywano tylko wśród badanych pacjentów z normozoospermią (I) (3% u ich partnerek – tabela 5.). Trudno jednak, jedynie na tej podstawie, domniemywać istnienia związków przyczynowych z niepłodnością u pacjentów z normozoospermią (I), szczególnie w kontekście obserwacji o nieobniżonej funkcji penetracyjnej plemników (tabele 5. i 6.). W większości przypadków wykrywanych mozaicyzmów w komórkach somatycznych brak jest badań i/lub równoległej informacji o ewentualnej obecności chromosomu markerowego w tkance gametogenicznej [344]. Dotychczas opisano segre-

gację meiotyczną chromosomu markerowego jedynie u dwóch płodnych mężczyzn nosicieli chromosomów markerowych bi-satelitarnych nieznanego pochodzenia [184] oraz w trzech przypadkach chromosomów markerowych der(15) [274, 278, 287]. W tych pięciu przypadkach chromosom markerowy wykrywano w 100% limfocytów krwi obwodowej. U trzech spośród pięciu nosicieli stwierdzono segregację meiotyczną chromosomu markerowego równą lub zbliżoną do 1:1, zatem zgodną z oczekiwaniami. U jednego z nosicieli chromosomu markerowego der(15), którego partnerka miała trzy wczesne poronienia wykryto chromosom markerowy tylko w 6,3% plemników [287]. Również u kolejnego nosiciela chromosom markerowy inv dup(15) wykryto tylko w 26% plemników [278]. Zdaniem autorów może to wskazywać na ogólny tkankowo-specyficzny mozaicyzm lub być skutkiem selekcji chromosomu markerowego tylko podczas spermatogenezy [287]. Mozaicyzm i niestabilność chromosomów markerowych może wynikać z mniej wydajnej replikacji w stosunku do prawidłowych chromosomów i/lub ze spowolnionego cyklu komórkowego. Najlepiej udokumentowanym zjawiskiem jest mozaicyzm będący konsekwencją przypadkowej utraty chromosomu markerowego w kolejnych podziałach mitotycznych zachodzących w trakcie życia osobniczego [345].

U pacjentów Nr 39 i Nr 15 (tabela 5.) analizowano segregację meiotyczną chromosomów markerowych wykrytych, w obydwóch przypadkach, w 4% limfocytów krwi obwodowej. U pacjenta Nr 39 nie udało się ustalić pochodzenie chromosomu markerowego co uniemożliwiło analizę chromosomów plemnikowych metodą FISH. Zatem badano chromosomy plemnikowe barwione metodą GTG, uzyskane z męskich przedjądrzy w wyniku ksenogenicznej penetracji do oocytów chomiczych (rycina 18.). Ograniczeniem tego podejścia metodycznego było tylko sto zanalizowanych kariotypów plemnikowych, natomiast zaletą było uwidocznienie innych, poza chromosomem markerowym, aberracji chromosomowych (Nr 39, tabela 15.). Stwierdzona w 7% plemników obecność chromosomu markerowego wskazuje, że w diploidalnej tkance gametogenicznej chromosom markerowy występował w minimum 14% komórek. W porównaniu z limfocytami oznacza to ponad 3-krotną kumulację w tkance gametogenicznej, co potwierdza sugestie, że występowaniu chromosomów markerowych często współtowarzyszy tkankowo-specyficzny mozaicyzm [345]. W przypadku pacjenta Nr 15 (tabela 5. i 15.), którego kariotyp opisano jako

46,XY[96]/47,XY, +mar[4].fishder(20)(wcp20+,D20Z1+) bezpośrednią przyczyną badania kariotypu były wczesne poronienia u partnerki (kariotypów płodów nie badano) (opis przypadku w rozdziale IV.2.2.). Chromosom markerowy der(20) został „odziedziczony” po matce pacjenta, u której występował w 3% limfocytów krwi obwodowej. U pacjenta stwierdzono 8% plemników z wykrytym (metodą FISH) chromosomem markerowym der(20) co wskazuje, że proporcja komórek gametogenicznych z chromosomem markerowym wynosiła minimum 16%. W porównaniu z limfocytami oznaczało to 4-krotną kumulację w tkance gametogenicznej. Jednocześnie w plemnikach pacjenta

stwierdzono podwyższoną częstość plemników 24,XY, co jest częstym zjawiskiem u mężczyzn ze wszystkimi typami niepłodności (patrz rozdział I.5., [158, 199]). W literaturze dotychczas opisano 14 przypadków nosicielstwa chromosomu markerowego der(20), ale tylko jeden pacjent był w wieku reprodukcyjnym [283, 315]. Stwierdzono u niego azoospermie, a chromosom markerowy wykryto w 80% limfocytów [283].

Nie można wykluczyć, że w przypadku badanego pacjenta Nr 15 (tabela 5. i 15.) z normozoospermia wczesne poronienia u partnerki były jedynie koincydentalne wobec obecności chromosomu markerowego w 8% plemników. Biologiczna rola chromosomów markerowych w poronieniach jest niejasna, ale przyjmuje się, że ryzyko poronień u nosicieli jest bardzo niskie [346, 347]. Jednocześnie wiadomo, że dla partnerów kobiet z kilkoma poronieniami charakterystyczna jest podwyższona częstość disomii chromosomów w plemnikach [348, 349]. Znane są również przypadki par o podwyższonym ryzyku poronień współtowarzyszącym mozaicyzmowi w gonadach [350]. Ocenia się, że wśród niepłodnych mężczyzn tzw. przypadków „mozaicyzmu germinального” może być 1%–17% [351, 352]. W rozdziale IV.2.2. opisano doświadczenia, które podjęto celem wykazania, że plemniki pacjenta Nr 15 ze zidentyfikowanym chromosomem markerowym der(20) posiadały zdolność penetracji oocytów (w teście SPA) oraz rozwoju chromatyny przedjądrza męskiego do chromosomów w stadium metafazy (rozdział IV.2.2.). Uzyskanie tylko osiemdziesięciu płytek metafazowych była przypuszczalnie przyczyną, z powodu której, ku pewnemu rozczarowaniu, chromosomu markerowego der(20) ... nie znaleziono (rycina 10.). Jednak potencjalne ryzyko niepowodzeń rozrodu w opisanych przypadkach mozaicyzmu komórkowego, choć prawdopodobnie bardzo małe i niemożliwe do precyzyjnego określenia, występuje i niezmiennie stanowi istotny problem dla poradnictwa genetycznego.

W wynikach dotyczących niepłodnych pacjentów z normozoospermia (I), z których aż 69% miało prawidłowe wyniki testu SPA i tylko 17% negatywne (tabela 5. i 6.), zwraca jednocześnie uwagę obserwacja, że wśród ich partnerek przeciwiała w służbie szyjkowym wykrywano znacznie częściej niż w grupie O;A;T (odpowiednio 15% i 1%) (tabela 8.). Obserwacja ta uzupełnia wcześniejsze dane literaturowe, których analiza prowadziła do wniosku, że w przypadkach niepłodności idiopatycznej relatywnie bardzo często o braku koncepcji decydować mógł nie domniemywany „czynnik” męski, ale współwystępowanie obniżonej (w niewielkim stopniu?) płodności (ang. subfertility) u obydwóch partnerów [353, 354, 355, 356]. W konsekwencji można przypuszczać, że w tych przypadkach naturalna koncepcja mogłaby mieć miejsce z partnerem biologicznym o bardzo dobrej płodności.

W grupie pacjentów z O;A;T (tabela 8.) odsetek wykrytych nosicieli translokacji (1,5%) był niższy niż w grupie z normozoospermia (6%) (tabela 5.). Ponadto dwóch nosicieli translokacji wykryto w grupie pacjentów z azoospermia

(10%) (tabela 8.). Łącznie, spośród wykrytych siedmiu translokacji (tabele 5. i 8.) cztery należały do translokacji wzajemnych (TCW) a trzy były translokacjami robertsonowskimi (TR) t(13;14), które są najczęściej spotykaną translokacją wśród pacjentów z niepowodzeniami rozrodu [357]. Nie stwierdzono jednoznacznej asocjacji między nosicielstwem translokacji i/lub obniżoną wartością testu SPA i cechami nasienia (tabela 33.). Wyniki te potwierdzają dane literaturowe wskazujące, że niezależnie od problemu poronień niezrównoważonych genetycznie płodów, związek nosicielstwa translokacji z niepłodnością (w znaczeniu braku koncepcji) jest trudny do ustalenia (patrz rozdział I.6.1.). Dobrze ilustruje to przykład trzech pacjentów, nosicieli translokacji t(13;14)(q10;q10) (Nr 33 w tabeli 5., Nr 56 oraz Nr 93 w tabeli 8.). Ta sama translokacja współwystępowała w przypadkach z normozoospermia i prawidłową wartością testu SPA (Nr 33), z astheneratozoospermia i obniżoną wartością testu SPA (Nr 56) oraz z azoospermia (Nr 93).

W grupie pacjentów z O,A,T odsetek wszystkich wykrytych wariantów (heteromorfizmów) chromosomów był blisko trzykrotnie wyższy w porównaniu z niepłodną grupą z normozoospermia (I) (tabela 33.). W obydwóch grupach pacjentów wykryto zarówno warianty będące inwersjami pericentrycznymi, jak i wydłużonymi blokami heterochromatyny oraz warianty długości ramion krótkich chromosomów akrocentrycznych (tabele 7 i 11). Większość klinicystów nie wiąże z ich występowaniem żadnych efektów genotypowych, ale jest szereg badań wskazujących na korelację z niepowodzeniami rozrodu [358, 359, 360, 361, 362, 363]. Są dane wskazujące, że konjugacja dwóch homologicznych chromosomów, takich jak 1 czy 9, z których jeden ma heteromorfizm w heterochromatynowym regionie, może być zaburzona [364, 365]. Wśród dużej grupy pacjentów poddawanych zabiegowi IVF opisano 29% mężczyzn oraz 17% kobiet z wariantami chromosomów [366]. W grupie z niepowodzeniami rozrodu badanej przez Teo i wsp. odsetek nosicieli wariantów wynosił aż 36% [361]. Podobnie wysoki odsetek (34%) nosicieli wariantów różnych chromosomów stwierdzili w 84 osobowej grupie niepłodnych mężczyzn Penna i wsp. [367]. Szacuje się, że w populacji ogólnej najczęściej rozpoznawana inwersja pericentryczna inv(9)(p11q12) występuje z częstością 1%–2%, natomiast wśród mężczyzn z niepowodzeniami rozrodu różnego typu częstość szacowana jest na 3,8%–4,2 [358, 362]. Z badań Collodola wynika, że wpływ tej inwersji na spermatogenezę jest zróżnicowany [358]. W populacji ogólnej wydłużony blok heterochromatyny 9qh+ występuje z częstością 6%–8% [362]. Eiben i wsp. [368] w badaniach dotyczących występowania heteromorfizmów u pacjentów z teratozoospermia określili częstość tego wariantu na 25% i spekulował, że obecność heterochromatynowych wariantów chromosomów może być jednym z wielu nierozpoznanych dotąd czynników zaburzających normalną spermatogenezę. Z kolei w badaniach Nakamury i wsp. [369] wśród 1790 niepłodnych mężczyzn najczęstszym wariantem (1,6%) był blok heterochromatyny 1qh+ wykrywany za-

równo wśród pacjentów z azoospermia, jak i normozoospermia [369].

Zarówno w grupie badanych pacjentów z normozoospermia (I), jak i z O;A;T odsetek nosicieli wariantów z jednoznacznie negatywnym wynikiem testu SPA był podobny do przypadków z kariotypem 46,XY (odpowiednio 17% i 17% oraz 31% i 26%) (tabela 33.). Jednocześnie, w obydwóch grupach średnia wartość testu SPA dla nosicieli wariantów była niższa (o około 20%) w porównaniu z przypadkami z kariotypem 46,XY (tabela 33.). Wskazuje to, że warianty chromosomów faktycznie upośledzały zdolność plemników do penetracji oocytów *in vitro* choć tylko w niewielkim stopniu i bez jednoznacznego związku z określoną wadą nasienia.

Interesująca wydaje się dodatkowa obserwacja, że odsetek wszystkich wykrytych wariantów u partnerek pacjentów zarówno z grupy I, jak i O;A;T (odpowiednio 8% i 10%) był wyższy niż w ogólnej populacji (około 2%). Wobec tej obserwacji ponownie nasuwa się przypuszczenie, że przyczyną bezdzietności u wielu spośród badanych par było współwystępowanie obniżonej płodności (ang. subfertility) u obydwóch partnerów. Stąd już tylko krok do być może kontrowersyjnej spekulacji, że mężczyźni i kobiety o obniżonej płodności zawierają między sobą związki częściej niżby to wynikało jedynie ze zdarzeń losowych.

2. Badanie wpływu mitotycznej niestabilności na poziom aneuploidii chromosomów w plemnikach

Uważa się, że jednym z wykładników zaburzonego procesu spermatogenezy, mogąym mieć związek z etiologią niepowodzeń rozrodu, jest podwyższona częstość aneuploidii chromosomów w plemnikach. Podwyższoną częstość aneuploidii (około 2–10 razy w porównaniu z kontrolą) obserwowano u mężczyzn z różnymi typami niepłodności. Przeważa jednocześnie pogląd, że nie ma prostych korelacji pomiędzy częstością aneuploidii w plemnikach a określoną wadą ejakulatu [158, 199]. Wiadomo jednak, że u pacjentów z bardzo silną oligoastheneratozoospermia, a szczególnie teratozoospermia, podwyższona częstość aneuploidii w plemnikach jest regułą [117, 218, 219, 370].

Przedstawione w tabeli 14. (rozdział IV.2.1.) wyniki dotyczące poziomu aneuploidii chromosomów plemnikowych w grupie pacjentów z niepowodzeniami rozrodu są zbliżone do danych literaturowych: wartości średnie (P) dla poszczególnych chromosomów (oraz poziomu poliploidii) były od 1,8 do 4,6 razy wyższe w porównaniu do średnich dla grupy kontrolnej (K) [191, 199]. Największa różnica dotyczyła wzrostu częstości aneuploidii chromosomu 21 (4,6 razy), a najmniejsza plemników o kariotypie 24,XY (1,8 razy), pomimo iż w plemnikach grupy kontrolnej ten rodzaj aneuploidii był najczęstszy. W wynikach z tabeli 14. zwraca uwagę obserwacja, że spośród badanych chromosomów średnia częstość disomii chromosomu X w plemnikach pacjentów z niepowodzeniami rozrodu była jedyną, która nie

była statystycznie wyższa w porównaniu z kontrolą (K) [199, 371]. Jednocześnie, poziom disomii chromosomu Y, który w plemnikach grupy kontrolnej nie różnił się od disomii X, w grupie pacjentów z niepowodzeniami rozrodu był statystycznie wyższy w porównaniu z grupą kontrolną (tabela 14.). W niektórych wcześniej opublikowanych pracach ich autorzy wykazywali kilkakrotnie wyższy poziom disomii chromosomu Y w porównaniu z disomią X [192]. W związku z tym, że obserwacje te dotyczyły także zdrowych mężczyzn kontrolnych można wykluczyć, aby w tych przypadkach zachodziła asocjacja ze współwystępowaniem mikrodelecji Yq.

Podobnie do doniesień innych autorów stwierdzono (tabela 14.) istotne różnice w indywidualnych wynikach: np. u pacjenta Nr 1 z oligoasthenozoospermią poziom disomii chromosomów X oraz Y był najwyższy w grupie (odpowiednio 3,4 razy oraz 5,3 razy więcej w porównaniu do średniej K). U drugiego pacjenta z oligoasthenozoospermią (Nr 3) takiej różnicy nie było (tabela 14.). Powyższe dane wskazują, że na wzrost poziomu aneuploidii w plemnikach mogą mieć wpływ różne czynniki i mechanizmy (trzeba też uwzględnić, że plemniki o kariotypie 24,XY powstają w wyniku błędów w mejozie I, natomiast disomia X lub Y w mejozie II) [371].

W nielicznych badaniach wykazano, że także u niektórych młodych, zdrowych mężczyzn o prawidłowych parametrach ejakulatu (i kariotypie somatycznym 46,XY) wykrywa się w plemnikach podwyższoną częstość aneuploidii chromosomów [192, 193, 372, 373]. Zjawisko to określono jako „stałe warianty aneuploidii” dla podkreślenia, że u tych mężczyzn podwyższony poziom aneuploidii w plemnikach utrzymywał się w badaniach powtarzanych na różnych próbkach ejakulatu przez kolejnych kilka lat [192, 193]. Szacuje się, że „stałe warianty aneuploidii” mogą występować nawet u 20% mężczyzn z grup kontrolnych [192]. Badania te wykonano tylko dla chromosomów 8, 13, 18, 21, X i Y oraz plemników diploidalnych. W niniejszych badaniach własnych (tabela 14.) uwzględniono także chromosom 15 (nie badano chromosomu 8). U dwóch mężczyzn z grupy kontrolnej (Nr 2 i Nr 7 w tabeli 14.) również obserwowano podwyższony poziom aneuploidii chromosomów w plemnikach; u mężczyzny Nr 7 dotyczył tylko chromosomu 15, natomiast u mężczyzny Nr 2 wszystkich badanych chromosomów (nie dotyczył plemników diploidalnych). Wyniki te potwierdziły się w dwóch analizach, ale były one powtórzone w stosunkowo krótkim odstępie czasowym. Jednak fakt, iż poziom aneuploidii w plemnikach mężczyzny Nr 2 był zbliżony do wyników pacjentów z grupy z niepowodzeniami rozrodu sugeruje, iż przynajmniej w jego przypadku może zachodzić zjawisko „stałych wariantów aneuploidii”. W badaniach Rubesa i wsp. [192] „stałe warianty aneuploidii” wykryte w plemnikach jednego zdrowego mężczyzny dotyczyły chromosomów XY, disomii X, disomii Y, disomii 8 oraz plemników diploidalnych. W plemnikach kolejnych trzech zdrowych mężczyzn Rubes i wsp. wykryli „stałe warianty aneuploidii” tylko dla jednego z badanych chromosomów: disomii 8, lub disomii X, lub plemników XY [192]. Natomiast w badaniach Tempest

i wsp. [373] w plemnikach od trzech zdrowych mężczyzn zidentyfikowano „stałe warianty aneuploidii”, które dotyczyły nullisomii chromosomów X lub Y, disomii 13 oraz plemników diploidalnych, ale nie dotyczyły plemników z disomią chromosomu X, Y lub 13.

Funkcjonalne znaczenie „stałych wariantów aneuploidii” w aspekcie ewentualnych niepowodzeń rozrodu nie było przedmiotem oddzielnych badań. Jest jednak prawdopodobne, że wśród tych mężczyzn występuje podwyższone ryzyko udziału w zapłodnieniu właśnie plemnika z aneuploidią [193]. Przypuszczenie, że może zachodzić asocjacja pomiędzy podwyższoną częstością aneuploidii w plemnikach a trisomią pochodzenia ojcowskiego wynika z analogii do wyników badań dotyczących poziomu aneuploidii w plemnikach ojców dzieci (lub płodów) z zespołem Downa, zespołem Klinefeltera i zespołem Turnera [194, 196, 197, 274, 374, 375, 376]. U wielu z tych ojców stwierdzano podwyższoną częstość aneuploidii chromosomów 13, 21, 22, X, Y i/lub plemników diploidalnych, co interpretowano jako konsekwencję „podatności” do nondysjunkcji chromosomów podczas mejozy [196, 377]. Także w przypadku pacjenta Nr4 (tabela 13. i 14.), który był ojcem jednego dziecka z trisomią 13 oraz drugiego z trisomią 21, stwierdzono w plemnikach podwyższoną (i większą niż średnia grupy P) częstość aneuploidii chromosomów 13 i 21. Jednocześnie w plemnikach pacjenta Nr 4 częstość aneuploidii chromosomów 15 i 18 była na poziomie wartości grupy kontrolnej (tabela 14.).

Teoretycznie, podwyższony poziom aneuploidii chromosomów plemnikowych może być pochodną zmienionego wewnątrzgonadowego mikrośrodowiska, prowadzącego do zakłócenia przebiegu mejozy (np. rekombinacji) i w konsekwencji mechanizmów kontrolujących segregację chromosomów meiotycznych. Do takiej interpretacji skłaniała się wcześniej większość autorów, przede wszystkim w oparciu o obserwacje, że w spermatocytach w pachytenie najczęstsza utrata miejsc rekombinacji dotyczyła właśnie chromosomów o najwyższym poziomie aneuploidii w plemnikach (chromosomy 21, 22, X i Y) [158, 159, 160, 161, 162, 166]. Kiedy jednak po raz pierwszy wykonano badania, w których bezpośrednio porównano częstość rekombinacji chromosomów (1, 9, 13, 21, X i Y) i częstość aneuploidii w plemnikach u tych samych mężczyzn z prawidłową spermatogenezą okazało się, że oczekiwanej korelacji nie stwierdzono (spermatocyty i plemniki pochodziły z biopsji gonad) [166]. Postawiono wówczas hipotezę „efektu progowego” zakładającą, że korelacja pomiędzy rekombinacją meiotyczną a aneuploidią w plemnikach zachodzi po przekroczeniu pewnego poziomu anomalii [170]. Natomiast taką korelację dla disomii YY oraz sumy aneuploidii chromosomów X i Y potwierdzono u pacjentów z nieobstrukcyjną azoospermią (w analogicznie przeprowadzonych badaniach na komórkach z biopsji jąder) [170]. Badania te jednocześnie pokazały, że konsekwencją zaburzeń w przebiegu mejozy mogą być zarówno zatrzymanie podziału i eliminacja komórki, jak i uniknięcie tego, co skutkuje aneuploidią.

W ostatnich latach coraz więcej danych wskazuje, że alternatywnie, podwyższony poziom aneuploidii w gametach mógłby wynikać z niestabilności w mechanizmie(ach) kontrolującym podziały komórkowe. Poprzez interferencję np. z organizacją mikrotubul wrzeczona podziałowego i ich wiązania z kinetochorem prowadziłyby to do błędów w segregacji chromosomów zarówno podczas mitozy, jak i mejozy [379, 380, 381, 382]. Jest również prawdopodobne, że w części przypadków etiologia podwyższonej aneuploidii chromosomów w plemnikach jest złożona; może być np. konsekwencją współwystępowania zaburzeń w organizacji mikrotubul i rekombinacji.

Wyniki wskazujące na występowanie asocjacji pomiędzy predyspozycją do nondysjunkcji chromosomów mitotycznych w komórkach somatycznych (limfocytach krwi obwodowej) i chromosomów mejotycznych u niepłodnych mężczyzn po raz pierwszy przedstawili Gazvani i wsp. [383, 384]. Badając u pacjentów z silną oligoasthenozoospermią poziom aneuploidii chromosomów 18, 21 X i Y równocześnie w plemnikach oraz w limfocytach stwierdzili, że podwyższona częstość aneuploidii chromosomów X i Y w plemnikach była skorelowana z podwyższoną częstością aneuploidii tych chromosomów w limfocytach (sygnały FISH liczono w 5000 jąder komórkowych w interfazie) [360, 383]. Najsilniejszą korelację stwierdzono dla chromosomu Y, w przypadku chromosomu 21 korelacja była mniejsza w porównaniu z X i Y, natomiast w przypadku chromosomu 18 nie została stwierdzona [383]. Różnice te mogłyby wynikać z niejednakowej dla wszystkich chromosomów „tendencji” do nondysjunkcji podczas mitozy [383, 384]. Na podstawie tych wyników przedstawiono wówczas hipotezę mówiącą, że jeśli w komórkach somatycznych zachodzi niestabilność mitotyczna, to dotyczy ona również komórek germinalnych dzielących się mitotycznie (spermatogonii), powodując tym samym wzrost częstości aneuploidii chromosomów w plemnikach [383, 384]. W związku z tym, że badaną grupę stanowili pacjenci z oligozoospermią Gazvani i wsp. [383, 384] ocenili, że w ich przypadku utrata około 10% plemników mogłaby wynikać z selektywnej degeneracji aneuploidalnych spermatocytów w konsekwencji „blokowania” podziałów komórkowych w „checkpoint” podziału komórkowego.

Zestawione w tabeli 14. dane dotyczące limfocytów oraz plemników zasadniczo potwierdzają obserwacje Gazvani’ego i wsp. [383, 384]. U pacjentów z niepowodzeniami rozrodu (Nr 1 – Nr 7) podwyższonej częstości aneuploidii chromosomów w plemnikach towarzyszyła podwyższona częstość aneuploidii w limfocytach krwi obwodowej. Porównując wartości średnie (P) dotyczące poziomu aneuploidii chromosomów w plemnikach i limfocytach u tych pacjentów, stwierdzono asocjację w występowaniu podwyższonej (w porównaniu do wartości średniej grupy kontrolnej K) częstości aneuploidii chromosomów 13, 15, 18, 21. Y oraz sumy aneuploidii chromosomów X i Y. Podwyższona częstość disomii

chromosomu X, którą stwierdzono tylko u dwóch pacjentów (Nr 1 oraz Nr 6), także była skorelowana z podwyższoną aneuploidią chromosomu X w limfocytach. Spośród tych pacjentów z grupy z niepowodzeniami rozrodu, których indywidualne wyniki były najwyższe w grupie, (czyli istotnie wyższe niż wartości średnie P), w dwóch przypadkach (Nr 4 i Nr 5), wyjątkowo wysokiej częstości aneuploidii badanych chromosomów w plemnikach towarzyszyła równie wysoka częstość aneuploidii w limfocytach krwi obwodowej. U pacjenta Nr 4 dotyczyło to aneuploidii chromosomów 13 oraz 21, natomiast u pacjenta Nr 5 chromosomu 15 (tabela 14.).

Obserwacja mówiąca, że u pacjentów z zaburzeniami spermatogenezy może jednocześnie występować predyspozycja do nondysjunkcji chromosomów w limfocytach znalazła poparcie w wynikach przedstawionych przez De Palma i wsp. [385]. Badali oni poziom aneuploidii chromosomów X, Y i 12 w jądrach komórkowych limfocytów w interfazie u pacjentów z oligoasthenozoospermią (OAT), z azoospermią oraz w trzech przypadkach azoospermii ze stwierdzonymi mikrodelecjami w chromosomie Y (w regionie Yq) [385]. W porównaniu z grupą kontrolną, w limfocytach pacjentów z OAT stwierdzono 5-krotnie, a u pacjentów z azoospermią 8-krotnie wyższą częstość aneuploidii chromosomów płci. Poziom aneuploidii chromosomów X i Y w limfocytach trzech pacjentów z mikrodelecjami w regionie Yq był taki sam, jak w przypadkach azoospermii bez takich mikrodelekcji. Ten wynik wskazuje, że w przypadku trzech badanych pacjentów z azoospermią mikrodelecje w regionie Yq nie były bezpośrednią przyczyną predyspozycji chromosomu Y do nondysjunkcji w komórkach somatycznych. Wcześniejsze doniesienia wskazywały na asocjację pomiędzy znacząco podwyższonym poziomem limfocytów z kariotypem 45,X a obecnością mikrodelekcji w chromosomie [148].

Przedstawione w tabeli 11. wyniki dotyczące pacjentów z azoospermią (Nr 8 – Nr 16, również w tabeli 10.) (bez mikrodelekcji w regionie Yq) są tylko w części zbliżone z rezultatami De Palma i wsp. [385] dotyczącymi pacjentów z azoospermią. Podobnie do wyników De Palma i wsp. [385] stwierdzono, że w grupie pacjentów azoospermią (Nr 8 – Nr 16) średnia częstość limfocytów o kariotypach 47,XXY lub 47,XYY była istotnie wyższa w porównaniu z grupą kontrolną (tabela 11.). Natomiast w przeciwieństwie do wyników De Palma i wsp. [385] nie stwierdzono różnic z wartościami średnimi (P) uzyskanych dla grupy pacjentów z niepowodzeniami rozrodu (tabela 14.). Ponadto, w grupie z azoospermią średni poziom disomii chromosomów 13, 15, 18 i 21 również był podobny do grupy z niepowodzeniami rozrodu, co jednocześnie oznacza, iż był istotnie wyższy w porównaniu z grupą kontrolną. Zwraca również uwagę fakt znacznych różnic w indywidualnych wynikach pacjentów z azoospermią (tabela 14.). Na przykład, większość wyników pacjenta Nr 12 (tabela 14.) nie różniła się od wyników grupy kontrolnej. Pacjent Nr 14 był jedynym, u którego zdiagnozowano całkowity brak podziałów mitotycznych w kanalikach nasiennych (tabela 13.). Teore-

tycznie, właśnie u tego pacjenta można by oczekiwać najwyższego poziomu aneuploidii chromosomów w limfocytach. Tego jednak nie stwierdzono; suma hiperploidii badanych chromosomów faktycznie była wyższa od średniej (A) dla całej grupy pacjentów z azoospermia, jednak nie odbiegała od wyników pacjentów z grupy z niepowodzeniami rozrodu (tabela 14.). Spośród wszystkich pacjentów (Nr 1 – 16) najwyższe częstości dotyczące aneuploidii w limfocytach wszystkich badanych chromosomów (wyjątkowo wysokie dla chromosomów 18 i 21) stwierdzono u pacjenta Nr 13, u którego zdiagnozowano zatrzymanie spermatogenezy na poziomie spermatogonii (tabela 13.). Wydaje się, iż szczególnie u pacjenta Nr 13 mogłoby znaleźć potwierdzenie przypuszczenie, że etiologia części przypadków niepowodzeń rozrodu/zaburzonej spermatogenezy może wynikać z niestabilności w mechanizmach kontrolujących podziały komórkowe, co powoduje, że mitotyczna niestabilność w komórkach somatycznych dotyczy również komórek germinalnych dzielących się mitotycznie [383, 384].

Bodaj najbardziej interesujące wyniki pochodzą z badań (na chromosomach 8, X i Y) Rubesa i wsp. [192] którzy wykazali, że także u tych mężczyzn z normozoospermia, u których stwierdzono „stałe warianty” aneuploidii w plemnikach, występowała korelacja z podwyższonym poziomem aneuploidii w limfocytach. Istotną korelację stwierdzono między plemnikami o kariotypie 24,XY a aneuploidią chromosomów płci w limfocytach. Natomiast nie stwierdzono istotnej korelacji pomiędzy disomią chromosomów X lub Y lub 8 w plemnikach a aneuploidią tych chromosomów w limfocytach [192]. Wyniki te wskazywały, że korelacja nie dotyczyła błędów powstałych w mejozie II. Ponadto fakt, iż mężczyźni ze „stałymi wariantami” aneuploidii w plemnikach mieli prawidłową liczbę plemników w ejakulacie pośrednio potwierdza, że obecność dodatkowego chromosomu X lub Y podczas podziału mejozytycznego niekoniecznie musi oznaczać zahamowanie tego procesu. Na możliwość, że komórki zawierające dodatkowe chromosomy X lub Y są zdolne do podziałów mejozytycznych już wcześniej zwracali uwagę inni autorzy [265, 386].

Z danych przedstawionych w tabeli 14., dotyczących mężczyzn Nr 2 i Nr 7 z grupy kontrolnej, wynika, że także w ich przypadku podwyższony poziom aneuploidii chromosomów w plemnikach występował z podwyższonym poziomem aneuploidii w limfocytach. U mężczyzny Nr 7 podwyższony poziom aneuploidii dotyczył tylko chromosomu 15. W przypadku mężczyzny Nr 2 asocjacja dotyczyła aneuploidii wszystkich badanych autosomów, disomii chromosomu X oraz sumy aneuploidii chromosomów X i Y. Podobnie do wyników Rubesa i wsp. [192] nie zaobserwowano korelacji między disomią chromosomów Y w plemnikach i w limfocytach (tabela 14.). Natomiast wysoki poziom disomii chromosomu X w limfocytach wskazuje, że korelacja może dotyczyć także błędów powstałych w mejozie II.

Interpretując wyniki dotyczące występowania „stałych wariantów” aneuploidii chromosomów X i Y w plemnikach oraz w limfocytach u zdrowych mężczyzn z normozoos-

spermia Rubes i wsp. [192] sugerowali, że osoby te mogłyby być nosicielami wariantów (polimorfizmów) genów kontrolujących wspólne czynniki w „checkpoints” cyklu komórkowego lub segregacji chromosomów mitotycznych i mejozytycznych. Nie można również wykluczyć, że mechanizmem prowadzącym do „stałych wariantów” aneuploidii jest podwyższona indywidualna wrażliwość na czynniki środowiskowe [192]. Z wcześniejszych badań Rubes i wsp. również wynikało, że wpływ pewnych czynników (środowiskowych) na wzrost poziomu aneuploidii może być ograniczony tylko do niektórych chromosomów: np. palenie papierosów powoduje wzrost disomii tylko chromosomu Y [387].

Jest bardzo prawdopodobne, że w części przypadków etiologia podwyższonej aneuploidii chromosomów w plemnikach jest złożona; to znaczy może być konsekwencją współwystępowania zarówno niestabilności w mechanizmie(ach) kontrolującym podziały komórkowe (np. organizację mikrotubul) jak i zaburzeń w rekombinacji.

3. Badanie wzoru segregacji mejozytycznej u nosicieli translokacji chromosomowych wzajemnych

Spośród anomalii chromosomowych wykrywanych u mężczyzn z niepowodzeniami rozrodu, kluczową rolę odgrywają translokacje wzajemne (zrównoważone) (TCW). U nosicieli TCW bezdzietność najczęściej nie wiąże się z brakiem koncepcji. Dla nosicieli TCW typowe są niepowodzenia rozrodu wynikające przede wszystkim z eliminacji niezrównoważonych genetycznie zarodków, poronień samoistnych i wczesnych zgonów noworodków. W niniejszych badaniach całą grupę nosicieli TCW stanowiło trzynastu mężczyzn (tabela 5., 8. i 17.). W tej grupie nieplodność z powodu braku koncepcji występowała w pięciu przypadkach (39%), w jednym przypadku wiązało się to z azoospermia (tabela 8.). Wśród dziewięciu nosicieli TCW, u których badano wzór segregacji mejozytycznej nie było nosiciela z brakiem koncepcji (tabela 17.). Z prac dotyczących analizy kariotypów u potomstwa nosicieli TCW wynikało, że w potomstwie wykrywane są tylko niektóre typy chromosomowego niezrównoważenia [cyt. za 226, 236]. Opublikowane dotychczas wzory segregacji mejozytycznej od około stu czterdziestu nosicieli TCW wykazały, że powstawanie niezrównoważenia genetycznego podczas mejozy jest wysoce zmienne w różnych translokacjach a nosiciele TCW zawsze produkują wszystkie typy niezrównoważonych gamet, choć w różnej proporcji (patrz rozdział I.6.1.1.). Pewne wątpliwości może budzić jedynie kwestia segregacji 4:0, która zachodzi rzadko i stąd jest trudna do stwierdzenia (patrz rozdział IV.3.). Zgodnie z oczekiwaniami, również w przypadku badanych nosicieli T1-T9 znaleziono segreganty należące do wszystkich typów segregacji (tabela 18.). Typowa dla nosicieli TCW wysoka częstość powstawania niezrównoważonych genetycznie zarodków jest prawdopodobnie konsekwencją braku prezygotycznej selekcji przeciwko plemnikom z nieprawidłowym kariotypem [237, 238, 239, 240]. Braku

takiej selekcji pośrednio dowodzą podobne wzory segregacji mejotycznej uzyskiwane na plemnikach tego samego nosiciela zarówno z ejakulatu, jak i po ksenogenicznej penetracji do oocytów [238, 239, 240]. Z badań wzorów segregacji mejotycznej wynika, że każda translokacja TCW ma swój specyficzny wzór segregacji mejotycznej (patrz rozdział I.6.1.1.). Badania te nie przyniosły jednak jednoznacznej odpowiedzi na pytanie, czy dla pewnych TCW może występować wspólny wzór segregacji niezależnie od zaangażowanych chromosomów. Badanie chromosomów plemnikowych nie przynosi informacji o częstości chiazmy w chromosomach tworzących kwadriwalent, co jest niezbędne do tworzenia układów modelowych (prognostycznych) [238, 239, 240]. W konsekwencji nie można np. stwierdzić, czy normalny i zrównoważony kariotyp plemnika jest produktem segregacji naprzemiennej lub przyległej I (patrz rozdział IV.3.). Natomiast ewentualne teoretyczne założenia co do częstości chiazmy w chromosomach zaangażowanych w kwadriwalent są utrudnione przez to, że częstość powstawania chiazmy dla tego samego chromosomu wykazuje dużą zmienność międzysobniczą i dodatkowo jest zmienną w różnych translokacjach [161, 388, 389, 390]. Z niektórych badań przeprowadzanych na materiale z biopsji jąder, w których była możliwość obserwacji korelacji pomiędzy konfiguracją kwadriwalentów a typem segregacji, można wnioskować, że translokacje bywają „nieprzewidywalne” [388, 391]. Mimo powyższych ograniczeń wzór segregacji mejotycznej uzyskany drogą badania chromosomów plemnikowych dostarcza ważnych danych kliniczno/prognostycznych. U tych nielicznych nosicieli translokacji, u których była możliwość porównania produktów segregacji mejotycznej poprzez badanie zarówno mejozy na materiale z biopsji jądra, jak i poprzez kariotypowanie plemników, wyniki były ze sobą zgodne [239, 240, 388].

Z analizy wzorów segregacji mejotycznej wszystkich dotychczas zbadanych pod tym względem translokacji wynika, że większość TCW prowadzi do produkcji około 35%–50% normalnych/zrównoważonych plemników, co jednocześnie oznacza, że w większości translokacji co najmniej połowa segregantów może być niezrównoważona [228, 231]. Spośród przedstawionych w tabeli 18. wzorów segregacji tylko w przypadku nosiciela T1 t(1;7) odsetek plemników normalnych/zrównoważonych był wyraźnie wyższy i wynosił 68%. Analiza wzorów segregacji potwierdziła ponadto, że zgodnie z teoretycznymi oczekiwaniami, większość segregantów należy do segregacji naprzemiennej i przyległej I [228, 232]. Tak było również w przypadku wszystkich nosicieli w tabeli 18. Natomiast z analizy wszystkich znanych wzorów segregacji wynika, że średnia częstość plemników po segregacji przyległej II oraz 3:1 jest wyższa, niż można było teoretycznie przewidywać [392, 393]. W tabeli 18. tylko w przypadku nosiciela T5 t(9;14) stwierdzono wyższy odsetek plemników po segregacji przyległej II w porównaniu z przyległą I. Wg Farauta i wsp. [392] wysokiej częstości tych segregantów sprzyjać może obecność krótkich odcinków interstycjalnych. Z kolei we wzorze

segregacji u nosiciela T3 t(7;13) charakterystyczny był wysoki (29,4%) odsetek plemników po segregacji 3:1. Podobną segregację opisano wcześniej tylko kilkakrotnie [394, 395, 396, 397, 398]. Wg Jalberta i wsp. [393] segregacji 3:1 sprzyjać może bardzo asymetryczna konfiguracja kwadriwalentu, często z udziałem chromosomów akrocentrycznych.

Badania wzoru segregacji mejotycznej w plemnikach przyniosły odpowiedź na pytanie dotyczące różnic/podobieństw we wzorach segregacji u nosicieli tych samych TCW występujących w rodzinach. Oprócz przedstawionej własnej analizy dotyczącej syna i ojca, nosicieli t(4;5) (T7 i T8, tabela 18.), znane są wyniki dotyczące wzorów segregacji w plemnikach u blisko spokrewnionych osób jeszcze w sześciu innych rodzinie występujących TCW [243, 399, 400, 401, 402, 403]. We wszystkich przypadkach stwierdzono, że nosiciele tych samych translokacji rodzinnych mają podobny wzór segregacji mejotycznej, a pewne różnice [243, 399] mieszczą się w zakresie błędu metody (trójkolorowy FISH w jądrach plemników). Podobny wzór segregacji utrudnił jednak wyjaśnienie kolejnego problemu, którym jest fakt, iż zaburzenia spermatogenezy i/lub brak koncepcji zdarzają się tylko u niektórych nosicieli tej samej translokacji rodzinnej [402]. Wcześniejsze badania nad przebiegiem mejozy (na materiale z biopsji jąder) również nie wyjaśniły przyczyn tych różnic [304]. Johannisson i wsp. [304] analizowali stadium pachytenu u trzech nosicieli z dwóch generacji trzypokoleniowej rodziny z translokacją t(9;12;13)(q22;q22;32). Jeden z badanych nosicieli był płodny, jeden niepłodny a jeden miał obniżoną płodność (ang. subfertile). Natomiast zarówno konfiguracja heksawalentu, jak i dalsza segregacja mejotyczna były u tych nosicieli podobne. W świetle powyższych wyników trzeba wziąć pod uwagę możliwość, że przynajmniej na część opisywanych w rodzinach nosicieli TCW różnic w reprodukcyjnych sukcesach rzutować może obniżona płodność partnerek.

W przypadku syna i ojca (nosiciele T7 i T8, tabele 17. i 18.) wewnątrzrodzinna zmienność dotyczyła różnic w spermatogenezie – tylko w przypadku syna (T7) stwierdzono teratozoospermie. Niektórzy autorzy sugerowali, że wykrywano u około 30% nosicieli różnych TCW tzw. efekt interchromosomowy jest charakterystyczny właśnie dla nosicieli z nieprawidłowym spermogramem (patrz rozdział I.6.1.1) [204, 245]. W plemnikach syna (nosiciel T7) stwierdzono hiperhaploidie chromosomu 15, natomiast u ojca (nosiciel T8) hiperhaploidie chromosomów X i Y, zatem nie był to efekt interchromosomowy związany z translokacją (tabela 14., T7 = Nr 5 i T8 = Nr 6). W przypadku ojca (nosiciel T8) można domniemywać, że hiperhaploidia chromosomów X i Y wynikała ze starszego wieku mężczyzny. Korelację między wiekiem a wzrostem poziomu aneuploidii chromosomów X i Y w plemnikach opisywano kilkakrotnie [154, 404]. Natomiast w przypadku syna (nosiciel T7) można spekulować, że teratozoospermia mogła mieć związek z hiperhaploidią chromosomu 15, bowiem

niektóre doniesienia wskazywały już wcześniej na takie korelacje [405].

Dotychczas, tylko w przypadku translokacji $t(11;22)(q23;q11)$, udało się przeprowadzić badania wzorów segregacji mejotycznej u niespokrewnionych nosicieli tej samej TCW w więcej niż w dwóch niezależnych ośrodkach. Jest to najczęstsza, powtarzająca się translokacja nierobertsonowska [394, 395, 398, 399, 406]. Uzyskano zbliżone, choć nie takie same wyniki, z charakterystycznym, bardzo wysokim odsetkiem segregantów 3:1. W tabeli 18. przedstawiono wzór segregacji (T4) w plemnikach nosiciela $t(7;9)(q36;p21)$, natomiast wcześniej Pellestor i wsp. [407] przedstawili wyniki u nosiciela bardzo podobnej translokacji $t(7;9)(q33;p21)$. W pracy Pellestor i wsp. [407] wyniki uzyskano zarówno metodą dwukolorowego FISH (co oznacza brak informacji o produktach segregacji przyległej I), jak i poprzez badanie chromosomów plemnika w stadium metafazy (po penetracji plemników do oocytów chomiczych), w której to metodzie wyniki dotyczą małej liczby segregantów. W przypadku obydwu wyżej wymienionych translokacji (T4 i w [407]) uzyskano takie same wyniki dotyczące segregacji naprzemiennej (około 44%) i przyległej II (około 12%); różnica w wynikach dotyczyła segregacji przyległej I oraz 3:1. Trudno jest jednoznacznie zinterpretować te różnice, bo pomimo podobieństwa translokacje nie były identyczne. Różnica w wynikach segregacji przyległej I mogłaby ewentualnie wynikać z różnic w metodzie badawczej bowiem w pracy Pellestor i wsp. [407] dane pochodzą z chromosomów w stadium metafazy a nie z trójkolorowego FISH. Jednocześnie jednak trzeba mieć na uwadze, że interpretując różnice w wynikach i/lub wyniki niezgodne z oczekiwaniami, dotyczące segregacji mejotycznej uzyskiwane metodą trójkolorowego FISH w jądrach komórkowych plemników trzeba uwzględnić fakt, że identyfikacja niektórych, spośród 16 możliwych segregantów, może być nieprecyzyjna [231]. Metoda ta wymaga jednoczesnego zastosowania do dwóch różnych chromosomów sond centromerowych i subtelomerowych, o różnej wielkości, wydajności hybrydyzacyjnej i intensywności sygnałów (patrz przykłady na rycinie 12D). W małym jądrze plemnika duże sygnały sond centromerowych mogą maskować niektóre sygnały sond telomerowych, w konsekwencji generując wzrost częstości segregantów o mniejszej liczbie sygnałów. Ponadto brak któregoś z sygnałów, interpretowany jako nieobecność określonego chromosomu w jądrze plemnika, jest nie do odróżnienia od artefaktu hybrydyzacyjnego, co może prowadzić do przeszacowania częstości segregantów z jednym chromosomem [237].

W związku z powyższym ograniczeniem metody trójkolorowego-FISH dotyczącym badań chromosomów plemnika, trudna jest jednoznaczna interpretacja innego zjawiska, które zwraca uwagę w znacznej części wzorów segregacji mejotycznej opisanych dotąd TCW. Chociaż modele segregacji mejotycznej przewidują równe proporcje komplementarnych segregantów w każdym z typów segregacji, to nie zawsze znajduje to eksperymentalne potwierdzenie [238, 386, 396, 397, 401, 402, 408,

409, 410, 411]. Nawet biorąc pod uwagę możliwość przeszacowania częstości segregantów z jednym chromosomem przy zastosowaniu metody trójkolorowego FISH, trzeba podkreślić, że brak modelowej proporcji 1:1 stwierdzano także stosując metodę kariotypowania chromosomów plemnikowych po penetracji do oocytów chomiczych [238, 401]. W tabeli 18. przykładem nierównych proporcji komplementarnych segregantów (tzn. zamiast modelowego stosunku 1:1, wystąpił stosunek powyżej 1,5) są translokacje: $t(1;7)$ (segregacja trzeciorzędowa i wymienna), $t(2;7)$ (segregacja trzeciorzędowa) oraz $t(7;13)$ (segregacja przyległa II, trzeciorzędowa i wymienna). Van Hummelen i wsp. [412] na przykładzie $t(1;10)$ stwierdzili, że brak proporcji 1:1 po segregacji przyległej I i przyległej II zachodzi w przypadkach nieukończony rekombinacji. W innych translokacjach to wyjaśnienie nie znalazło jednak potwierdzenia [410, 413]. Niektórzy autorzy rozważali możliwość różnej przeżywalności spermatyd np. ze względu na brak lub duplikację istotnych dla spermatogenezy genów zlokalizowanych na translokowanym segmentcie [401, 408]. Wczesną selekcję podczas spermatogenezy jednego z segregantów wykazano w przypadku $t(7;8)$ [414]. Natomiast w przypadkach translokacji $t(11;17)$ i $t(10;14)$ takiej selekcji nie stwierdzono [415].

U nosiciela określonej translokacji TCW wielkość ryzyka poronień i/lub urodzenia nieprawidłowego potomstwa jest sumą prawdopodobieństwa, z jakim produkowane są nie zrównoważone gamety oraz prawdopodobieństwa zdolności przeżycia płodu z nie zrównoważonym kariotypem do terminu porodu [226]. Wielkość ryzyka przewidywana jest na podstawie modeli prognozujących takie prawdopodobieństwo [393, 416]. Szacuje się, że wśród badanych polskich rodzin nosicieli różnych translokacji TCW średnio 76% miało szansę posiadania zdrowego potomstwa (około 17% miało wysokie a 58% niskie ryzyko urodzenia nieprawidłowego dziecka) [226]. Najczęściej jednak indywidualne ryzyko różni się od wartości średnich uzyskiwanych w badaniach populacyjnych. Trudności, czy wręcz niemożność bezpośredniego określenia indywidualnego ryzyka niepowodzenia reprodukcyjnego, wynikają zarówno z unikatowości większości TCW, jak i z braku informacji o wzorze segregacji mejotycznej w plemnikach oraz z małej liczebności rodowodów. Wiadomo, że nawet bardzo podobne translokacje, różniące się nieznacznie w jednym z punktów pęknięcia, niosą ze sobą znacząco różne ryzyko urodzenia dziecka z wadami [417]. Można przypuszczać, iż jest to konsekwencją występowania istotnych różnic w genetycznej informacji w nie zrównoważonych segmentach [cyt. za 417]. Być może, znaczenie ma również zjawisko znane z badań na modelu zwierzęcym, że to samo nie zrównoważenie może mieć różny efekt w zależności od genetycznego tła [cyt. za 388]. Kiedy porównuje się ze sobą wzory segregacji mejotycznej w podobnych translokacjach (to znaczy takich, w które zaangażowane są takie same chromosomy), w niektórych translokacjach podobne są częstości wszystkich lub większości typów segregacji.

Przykładami są wzory segregacji w $t(9;17)(p13;q21.3)$ i $t(9;17)(q12;p12)$ oraz w $t(3;9)(q26.2;q32)$ i w $t(3;9)(p25;q32)$ [410, 413]. Nie jest to jednak regułą i różnice w częstościach mogą dotyczyć większości typów segregacji. Przykładem są tu $t(5;7)(q13;p15.1)$ i $t(5;7)(q21;q32)$ [182, 413, 418] oraz $t(11;18)(q23;q23)$ i $t(11;18)(q22;q21.3)$ [243]. Przykładem całkowicie odmiennych wzorów segregacji, w które zaangażowane są takie same chromosomy jest opisana w tabeli 18. subtelomerowa translokacja $t(4;8)(p16.1;p23.1)$ oraz translokacja $t(4;8)(q28;p23)$ [238]. Różnice te prawdopodobnie są pochodną różnej możliwości powstawania chiazmy w odcinkach interstycjalnych, co nawet przy podobnej konfiguracji kwadriwalentu w diakinezie może decydować o wzorze segregacji mejozy [153, 392].

Nieliczne dane literaturowe przedstawiają zarówno wzór segregacji mejozy, jak i dane rodowodowe nosiciela translokacji [388]. Zestawiając ze sobą te informacje trzeba pamiętać, że nawet w przypadku dużych rodowodów nie są znane kariotypy większości poronionych zarodków/płodów. Z przedstawionego w tabeli 19. porównania wzorów segregacji oraz prawdopodobieństwa niepowodzenia rozrodu obliczonego na podstawie danych rodowodowych dotyczących męskich nosicieli widać, w jakim zakresie dane te ze sobą niezgodne. Wydaje się, że w przypadku braku danych rodowodowych, na pewno można bezpośrednio ze wzoru segregacji mejozy, bez ryzyka przeszacowania, odczytać prawdopodobieństwo posiadania potomstwa bez wad. Natomiast do oszacowania prawdopodobieństwa posiadania potomstwa z określonym typem niezrównowazenia potrzebne są informacje z bazy danych empirycznych o przeżywalności indywidualnych płodów z kombinacją niezrównoważonych kariotypów [318].

W przypadku nosiciela translokacji $t(2;7)$ (T2 w tabelach 17., 18. i 19.) porównano wzór segregacji mejozy z wynikami przedimplantacyjnego kariotypowania (PGD) (tabela 21.). Zarówno odsetek zarodków zrównoważonych genetycznie (37,5%) jak i zarodków powstałych w wyniku zapłodnienia plemnikiem po segregacji przyległej 1 (37,5%) był podobny do odsetka plemników po segregacji naprzemiennej (34,2%) i plemników po segregacji przyległej 1 (33,2%) (tabela 21.). Z danych literaturowych wynika, że zastosowanie metody PGD w przypadku nosiciela translokacji redukuje częstość poronień ale częstość ciąży jest proporcjonalna do częstości normalnych/zrównoważonych plemników [248, 419]. Wzór segregacji mejozy porównywano z wynikami PGD w około 20 różnych translokacjach i stwierdzono, że więcej niż 60% niezrównoważonych plemników oznacza dla nosiciela złą prognozę na uzyskanie potomstwa [394, 398, 419, 420, 421]. Escudero i wsp. [394] zaobserwowali, że korelację między odsetkiem niezrównoważonych genetycznie plemników i odsetkiem niezrównoważonych zarodków można wyrazić wzorem: $A = -55 + (1,9 \times B)$, gdzie A jest procentem niezrównoważonych zarodków a B plemników [419]. Odpowiednio do tego wzoru, u nosiciela T2 $t(2;7)$ (tabela 19. i 21.) (65,8% niezrównoważonych plemników) przewidywany procent powstania w PGD niezrównoważonych zarodków wyniósł

70%. Natomiast w pierwszym cyklu ICSI powstało mniej, bo 62,5% niezrównoważonych zarodków. Jednocześnie, wbrew mało optymistycznym teoretycznym przewidywaniom, powstały trzy normalne/zrównoważone zarodki, wystarczające do sukcesu reprodukcyjnego, którym jest zdrowa dziewczynka o prawidłowym kariotypie.

4. Badanie topologii chromosomów w plemniku

Badania przestrzennej organizacji chromosomów w jądrze ludzkiego plemnika obejmują topologię telomerów, centromerów i/lub terytoriów chromosomowych. Dane literaturowe z ostatnich lat wskazują, iż topologia ta jest na tyle charakterystyczna, iż nie może być przypadkowa i ma fizjologiczne znaczenie dla procesów prowadzących do aktywacji ojcowskiego genomu po zapłodnieniu [70, 422]. Zasadniczymi cechami topologii są: centralna lokalizacja chromocentrum, peryferyjna lokalizacja (dimerów) telomerów tego samego chromosomu oraz określona, liniowa (tzn. wzdłuż dłuższej osi plemnika) pozycja terytoriów poszczególnych chromosomów [76]. Biorąc pod uwagę przynajmniej jedną z wymienionych cech, analizowano w ludzkich plemnikach topologię wszystkich chromosomów [10, 76, 92, 98, 99, 100, 101, 106, 423, 424].

W niniejszej pracy przedstawiono preferencyjną (średnią) lokalizację (liniową i radialną) centromerów wybranych chromosomów (7, 9, 15, 18, X i Y) w jądrach komórkowych plemników mężczyźni z prawidłową spermatogenezą (rozdziały IV.4.1.1 i 4.2.1.). Ponadto zbadano, że nieprawidłowa spermatogeneza, typowa dla nosicieli translokacji wzajemnych zrównoważonych (TCW) lub objawiająca się podwyższonym poziomem aneuploidii, zaburza topologię chromosomów w plemniku (rozdziały IV.4.1.2, 4.1.3, 4.2.2. i 4.2.3.). W przypadku chromosomu Y dodatkowo ustalono, że telomery (p oraz q) tego małego chromosomu także tworzą dimery (rozdział IV.4.2.5).

Analiza wyników dotyczących preferencyjnej lokalizacji liniowej wykazała, że u płodnych mężczyzn w większości plemników (55–60%) centromery badanych chromosomów (7, 9, 15, 18, X i Y) występowały w centralnej części jądra komórkowego (rycina 14.). Wyniki te były zbliżone do lokalizacji opisywanej przez większość autorów [92, 99, 106]. Jednak z badań Sbracia i wsp. [423] wynikało, że preferencyjna liniowa lokalizacja chromosomu 18 ma miejsce w części jądra plemnika blisko witki. Różnice w szczegółowych wynikach dotyczących topologii chromosomów mogą wynikać z faktu, iż badania te nie są jeszcze wystandaryzowane. Przykładowo, niektórzy autorzy stosowali sondy centromerowe [92, 423] a inni sondy malujące terytorium chromosomowe [92, 98, 99, 100, 106]. Ponadto używany był podział jądra komórkowego na dwa regiony [99], trzy regiony [423] lub cztery regiony [10, 92]. Wydaje się, że w badaniach dotyczących topologii chromosomów, w których stosuje się różne modele graficzne, najbardziej obiektywne jest porównywanie wyników dotyczących

lokalizacji radialnej, w której eksperymentalnie określone parametry wymagają normalizacji [92, 101].

Przedstawione wyniki własne dotyczące lokalizacji radialnej (rycina 18.), potwierdziły wcześniejsze doniesienia [65, 92], że w jądrach plemników lokalizacja centromerów jest ograniczona do stosunkowo małej przestrzeni zlokalizowanej w centralnej części jądra plemnika (nieco przesuniętej w kierunku części akrosomowej). Przestrzeń ta, obejmująca centromery wszystkich chromosomów plemnikowych tworzy tzw. chromocentrum [65, 92]. Chromocentrum zostało opisane także u innych badanych gatunków: myszy, szczurów i kurcząt [108, 424, 425]. Zatem przedstawiony obszar dotyczący lokalizacji tylko kilku spośród 23 chromosomów plemnika (rycina 18.) potencjalnie stanowi pewien fragment chromocentrum. Trzeba jednak nadmienić, że choć możliwość występowania w jądrze plemnika wyodrębnionego obszaru chromocentrum jest aktualnie powszechnie akceptowana, a fakt występowania chromocentrum poprzedza szereg dowodów pośrednich [93], to struktury całego chromocentrum dotychczas nikt ...nie widział”. Bowiern taka wizualizacja wymagałaby uwidocznienia w niespęczniałym jądrze plemnika jednocześnie wszystkich 23 centromerów. Jak dotąd penetracja sond centromerowych (metoda FISH) do niespęczniałych jąder plemników jest mało efektywna. Chociaż, z ustnej informacji wynika, że A. Zalensky uzyskał zdjęcie plemnika z widocznym całym chromocentrum [A. Zalensky, 2007, informacja ustna].

Przedstawione badania własne (rycina 18.) potwierdziły wcześniejsze doniesienia, że preferencyjna lokalizacja centromeru chromosomu X jest charakterystyczna, bo bliska części akrosomowej [92, 99, 100]. Taka lokalizacja budzi szczególnie zainteresowanie, bowiem subakrosomowa część jądra plemnika jest regionem zbliżonym do miejsca pierwszego kontaktu z oocytem [103]. Choć jedynie pośrednio, ale przedstawione w tabeli 28. wyniki dotyczące lokalizacji centromeru chromosomu X we frakcji plemników odpłukanych z powierzchni oocytów mogą wskazywać na fizjologiczne znaczenie subakrosomowej topologii tego chromosomu w jądrze plemnika. Otóż, w żadnym plemniku z tej frakcji nie stwierdzono lokalizacji chromosomu X w części (w) jądra komórkowego (tzn. bliżej witki). W związku z preferencyjną subakrosomową lokalizacją chromosomu X w jądrze plemnika spekulowano, że może być ona czynnikiem sprzyjającym wzrostowi częstości aberracji chromosomowych u dzieci urodzonych w wyniku procedury ICSI, (choć wzrost ten jest stosunkowo niski) [99]. Obserwacje wskazują, że dekondensacja chromatyny po procedurze ICSI przebiega najmniej sprawnie właśnie w części subakrosomowej jądra plemnika. To mogłoby powodować zakłócenia w replikacji i błędy przy pierwszym podziale zygoty [106].

Silnym argumentem potwierdzającym fizjologiczne znaczenie topologii chromosomu X w plemniku byłaby analogiczna jego lokalizacja w plemnikach u innych gatunków ssaków. Choć u wielu zbadanych gatunków tak jest, to doświadczenia na plemnikach świń wykazały inną (centralną) pozycję chromosomu X [107]. Trzeba

zaznaczyć, iż bezpośrednie porównywanie topologii chromosomów w plemnikach różnych gatunków jest szczególnie utrudnione, ze względu na znaczne różnice w kształcie plemników. Stąd, między innymi, niewiele wiadomo na temat ewentualnego ewolucyjnego konserwatywności topologii chromosomów plemnikowych [104]. Interesujące badania nad topologią chromosomów płci w plemnikach dziobaka (stekowce) wykazały, że u tego gatunku chromosomy X i Y mają taką samą (centralną) lokalizację. Sugerowano, iż jest to konsekwencją mejozytycznej asocjacji chromosomów X i Y [104]. Jest bardzo prawdopodobne, że w trakcie ewolucji ssaków repozycja chromosomu X do subakrosomowej części jądra plemnika przebiegała u różnych gatunków niezależnie [104].

Przedstawione badania własne (rycina 18.) wykazały, że w ludzkich plemnikach radialna pozycja centromeru chromosomu Y jest centralna, zatem różna od subakrosomowej chromosomu X. Wyniki te potwierdzają lokalizację opisaną wcześniej przez Zalenskaya & Zalensky [92]. Jednocześnie, analizując wyniki dotyczące właśnie chromosomu Y (grupa kontrolna K: ryciny 19. i 21.) zwrócono uwagę na nieopisany wcześniej w literaturze fakt występowania istotnych różnic międzyosobniczych w topologii centromerów, w obrębie chromocentrum. Stosowane dotychczas przez innych autorów podejście metodyczne uniemożliwiało dokonanie takich obserwacji: w opublikowanych pracach prezentowano jedynie uśrednione wyniki dla badanej grupy [423]. Alternatywnie, badania wykonywano na puli plemników pochodzących od kilku dawców jednocześnie lub odwrotnie, tylko na plemnikach od jednego mężczyzny [10, 92, 101, 426]. Pewne międzyosobnicze różnice w lokalizacji radialnej zaobserwowano także w przypadku centromerów chromosomów 9, 15 i 18 i X (grupa kontrolna K: ryciny 19. i 21.). Choć indywidualne wyniki pochodzą tylko od kilku mężczyzn wydaje się, iż w przypadku chromosomu Y mogą wskazywać, że w chromocentrum (przynajmniej w obrębie tego fragmentu chromocentrum, który był objęty badaniami) pozycja centromeru chromosomu Y jest przypadkowa. Na tym etapie badań nie ma możliwości wytłumaczenia, dlaczego największą zmienność międzyosobniczą zaobserwowano akurat w przypadku chromosomu Y. Nasuwające się przypuszczenia, co do ewentualnego związku z długością i/lub polimorfizmem długości chromosomu Y nie znalazły, jak dotąd, uzasadnienia w danych literaturowych. Nie stwierdzono dotychczas korelacji pomiędzy wielkością chromosomu a jego pozycją w plemniku [16, 104, 107]. Prawdopodobnie na przestrzenną organizację chromosomów nie ma także wpływu obecność dużego bloku heterochromatyny regionu Yqh12 [426].

W przypadku lokalizacji chromosomu 7 indywidualne wyniki u wszystkich badanych mężczyzn z grupy kontrolnej były identyczne (rycina 19.). Nie można jednak wykluczyć, iż badania na znacznie liczniejszej grupie mężczyzn również wykazałyby zmienność międzyosobniczą. Jedynie pośrednio, ale wskazuje na to fakt, że pozycja centromeru chromosomu 7 w chromocentrum określona przez Zalenskaya & Zalensky [92] jest inna

aniżeli przedstawiona na rycinie 18. Gdyby wyniki Zalenskaya & Zalensky [92] były uzyskane na plemnikach pochodzących od jednego dawcy, (co jest bardzo prawdopodobne), to różnica ta mogłaby wskazywać na zmienność międzyosobniczą dotyczącą także chromosomu 7. W innym wypadku, różnica ta jest trudna do wyjaśnienia.

Dane literaturowe na temat wpływu aberracji struktury i liczby chromosomów na architekturę wewnątrzjądrową są nieliczne [427]. Jedyne w badaniach na myszach z translokacją robertsonowską opisano duże zmiany chromosomowych terytoriów w jądrach komórkowych spermatogonii, spermatocytów i spermatyd [427]. Na ludzkich plemnikach badania takie nie były dotąd prowadzone. Przedstawione doświadczenia własne wykazały zmiany w liniowej i przestrzennej lokalizacji centromerów chromosomów 7 i 9 w plemnikach nosiceli kilku różnych translokacji (TCW) dotyczących tych chromosomów (ryciny 15. i 19.). Jednocześnie okazało się, że obecność w jądrach plemników chromosomów z translokacją może mieć także wpływ na zmianę topologii chromosomów nie zaangażowanych w daną translokację (X i Y) (ryciny 15. i 19.). W konsekwencji, w plemnikach nosiceli badanych translokacji region chromocentrum był powiększony i przesunięty w kierunku subakrosomowej części w porównaniu z plemnikami kontrolnymi (rycina 20.). Indywidualne wyniki, uzyskane dla nosicieli poszczególnych translokacji i dotyczące lokalizacji każdego z badanych chromosomów, różniły się między sobą (rycina 19., tabela 31.). Punktem odniesienia dla tych wyników była preferencyjna lokalizacja centromerów badanych chromosomów ustalona na plemnikach grupy kontrolnej (K). Natomiast nie obliczano wartości średnich dla całej grupy nosicieli translokacji (T1-T6), gdyż w większości przypadków różne translokacje uważane są za unikatowe. Pomimo iż w czterech z badanych translokacji (T1-T4) zaangażowany był chromosom 7 z podobnym miejscem pęknięcia to we wszystkich translokacjach (T1-T6) pary chromosomów były różne (tabela 23.). Być może właśnie te różnice wpłynęły na fakt, iż każda z translokacji skutkowała odmiennym wpływem na zmianę topologii centromerów chromosomów 7, 9, X i Y (rycina 19.). Z podsumowania przedstawionego w tabeli 31. wynika, iż pomimo pewnych międzyosobniczych różnic w topologii centromerów chromosomów 7, 9, X i Y w plemnikach kontrolnych (38% różnic), można stwierdzić, że obecność chromosomów z translokacją w istotny sposób wpływa na zwiększenie tych różnic (do 75%). Trzeba jednak podkreślić, iż w przypadku chromosomu Y ocena, czy różnice w topologii (rycina 19.) wynikają z destrukcyjnego wpływu chromosomów z translokacją na chromocentrum, czy są wynikiem tylko różnic międzyosobniczych, jest niejednoznaczna.

Sugeruje się, że w plemnikach nosicieli translokacji (TCW) wykryte przesunięcia centromerów w obszarze chromocentrum (rycina 20.), którym prawdopodobnie towarzyszą również zmiany w terytoriach chromosomowych, mogą mieć dalsze biologiczne konsekwencje.

Wcześniej Gurevitch i wsp. [101] spekulowali, że zaburzenia w topologii chromosomów mogą wywierać wpływ na normalny kształt główki plemnika, obniżając tym samym zdolność plemników do zapłodnienia. Jednakże, wszyscy nosiciele TCW (T1-T6) opisani w pracy nie wykazywali zmian w morfologii plemników i byli płodni (tabela 17.). Ponadto wiadomo, że brak jest asocjacji pomiędzy morfologią plemnika a disomią chromosomów plemnikowych [117, 428]. Przeważa również pogląd, że nie zachodzi przygotyczna selekcja przeciwko chromosomowo nie zrównoważonym ruchliwym plemnikom, natomiast typowe dla nosicieli translokacji TCW niepowodzenia rozrodu są przede wszystkim konsekwencją eliminacji genetycznie nie zrównoważonych zygot [242]. Należy jednak wziąć pod uwagę, że zmieniona topologia chromosomów w plemniku może mieć wpływ na pozycję chromosomów podczas pierwszego podziału mitotycznego w zygocie. Przedstawione dane (rycina 19. i rycina 20.), wskazujące, że obecność chromosomów z translokacją wpływa także na lokalizację innych chromosomów, mogą wyjaśniać pewne obserwacje pochodzące z genetycznej diagnostyki przedimplantacyjnej (PGD) [419, 429, 430]. Otóż z badań tych wiadomo, że w blastomerach pochodzących od nosicieli translokacji TCW występuje znacznie podwyższony poziom aneuploidii chromosomów (zarówno zaangażowanych w daną translokację, jak i niezaangażowanych). Ponadto, w blastomerach tych stopień mozaicyzmu liczby chromosomów jest wyższy niż w grupach kontrolnych oraz wyższy, niż wynikałoby to ze wzoru segregacji mejotycznej [419, 429, 430]. Iwarsson i wsp. [429] sugerowali, że na ten „dodatkowy stopień chaosu” wpływ mają nieznanne czynniki, różne w przypadku indywidualnych nosicieli TCW. Przedstawione w tej pracy wyniki pozwalają spekulować, że jednym z tych czynników może być zaburzona topologia chromosomów w plemnikach nosicieli translokacji (ryciny 19–20).

Nieliczne dane literaturowe dotyczą topologii chromosomów w plemnikach mężczyźn z niepowodzeniami rozrodu (o prawidłowym kariotypie somatycznym) [423, 431, 432, 433]. W badaniach na plemnikach pochodzących z kilkusobowej grupy pacjentów z niepłodnością idiopatyczną stwierdzono zaburzenia w architekturze wewnątrzjądrowej, które związane były z: 1) nietypowym „upakowaniem” terytoriów chromosomowych, 2) niestałością w pozycji chromosomów oraz 3) brakiem interakcji między telomerami [433]. Zbadano również, że w plemnikach z podwyższonym poziomem uszkodzeń (fragmentacji) DNA obniżeniu ulegała liczba telomerów tworzących dimery, co w konsekwencji oznaczało utratę charakterystycznej dla chromosomów plemnikowych struktury „wsuwki do włosów” [432]. Natomiast w badaniach wykonanych na plemnikach 14 pacjentów z oligo-astheno-teratozoospermią, z zastosowaniem sond FISH dla chromosomów 18, X oraz Y, zaobserwowano w połowie przypadków zmienioną wewnątrzjądrową pozycję chromosomów X i Y [431].

Wyniki własne, dotyczące lokalizacji radialnej (ryciny 17., 21–23 oraz tabela 31.) po raz pierwszy wskazały na

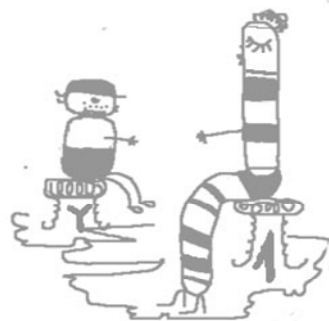
możliwość, że jednym z czynników zaburzających architekturę wewnątrzjądrową w plemnikach może być podwyższony poziom aneuploidii chromosomów. W plemnikach pacjentów z podwyższonym poziomem aneuploidii chromosomów plemnikowych radialna pozycja centromerów chromosomów 15, 18 i X różniła się istotnie od wyników w grupie kontrolnej (ryciny 21. i 22.). W konsekwencji, badany fragment chromocentrum w plemnikach pacjentów wykazywał zmienioną wewnątrzjądrową pozycję (choć w znacznie mniejszym stopniu, w porównaniu z analogiczną zmianą obserwowaną w plemnikach nosicieli translokacji) (rycina 23.).

Przedstawione wyniki własne dotyczące liniowej lokalizacji centromerów chromosomów 15, 18, X i Y u pacjentów z niepowodzeniami rozrodu i podwyższonym poziomem aneuploidii były podobne do wyników uzyskanych w grupie kontrolnej: w 55–60% plemników badane centromery występowały w centrum plemnika (rycina 16). Różnice w wynikach pomiędzy pacjentami obserwowano w przypadku centromerów chromosomów 15, X i Y, natomiast w przypadku chromosomu 18 wyniki żadnego z pacjentów nie różniły się od wyników grupy kontrolnej. Podobne wyniki, uzyskane na grupie pacjentów z oligozoospermią, przedstawili Sbracia i wsp. [423]. W przeciwieństwie jednak do naszych wyników (25% wg danych z tabeli 27.), w 54% plemników (zarówno kontrolnych, jak i od pacjentów) chromosom 18 zlokalizowany był w części jądra komórkowego bliżej witki. Prawdopodobnie różnica ta jest pochodną faktu, iż centromery chromosomu 18 najczęściej zlokalizowane były blisko lub na samej granicy między obszarem (w) a obszarem (c) (wg schematu na rycinie 5.).

W związku z tym, że plemniki pacjentów z niepowodzeniami rozrodu wykazywały podwyższony poziom aneuploidii (tabela 26.) sprawdzono, jaki wpływ na lokalizację liniową centromerów chromosomów 15, 18, X i Y wywiera obecność w jądrze plemnika dodatkowego chromosomu (rycina 17.). Uzyskane wyniki sugerują, że

disomia chromosomów może zmieniać topologię chromosomów w plemnikach. W porównaniu z plemnikami o prawidłowym kariotypie ($n = 23$), w hiperhaploidalnych jądrach plemników ($n+1$) preferencyjna liniowa lokalizacja centromerów chromosomów 15,15 lub 18,18 lub Y,Y wykazywała różnice (rycina 17.). Lokalizacja centromerów dwóch chromosomów 18 „przesunięta” była w jądrach plemników w stronę witki, a centromerów dwóch chromosomów Y do centrum. Natomiast dodatkowe chromosomy X zlokalizowane były tak samo jak pojedyncze w prawidłowych plemnikach (rycina 17.). Ze względu na „subakrosomową” topologię chromosomu X obserwacja ta wydaje się być interesująca. Jednak nie można jeszcze przesądzać, czy brak różnic między lokalizacją pojedynczego a dodatkowego chromosomu X jest charakterystyczny tylko dla tego chromosomu, bowiem badania topologii w plemnikach o kariotypie ($n+1$) wykonano dotychczas na chromosomach 15,18, X i Y (rycina 17.) a jednocześnie, brak jest innych odniesień literaturowych.

Na podstawie ustalonej dla naszych pacjentów częstości hiperhaploidii dotyczącej kilku wybranych chromosomów (tabela 26.) można oszacować, że, w co najmniej 10% badanych plemników występowała aneuploidia jednego z 23 chromosomów. Stąd wydaje się uzasadniona spekulacja, iż to właśnie aneuploidia chromosomów plemnikowych mogła być przyczyną obserwowanych zmian w topologii (ryciny 22–23). Przypuszcza się, że jednym z warunków prawidłowego przebiegu mejozy jest restrykcyjna organizacja migracji chromosomów [384]. Obecność disomicznych chromosomów może zaburzać tę organizację i w konsekwencji powodować zmiany w topologii chromosomów w plemniku. Nie można jednak wykluczyć, że różnice w chromocentrum w plemnikach mężczyzn z niepowodzeniami rozrodu mogłyby mieć swoją przyczynę w zmienionej organizacji chromosomów interfazowych w komórkach prekursorowych (germinalnych), spowodowanej nieprawidłową aktywnością transkrypcyjną.



Chromosom **Y** zagaduje swą Sąsiadkę, piękny chromosom **1**:

- Kochanie, czy masz korzystną lokalizację? - pyta **Y**
- Tak, bardzo korzystną! - odpowiada **1**
- Na pewno jest ci wygodnie? protaminy nie uwierają? sąsiednie centromery nie popychają? - upewnia się **Y**
- Ależ wszystko jest w porządku! - potwierdza **1**
- Zatem, mój skarbie ... zamieniamy się miejscami!!! - woła **Y**

Ryc. 26. „Korzystna lokalizacja”, czyli „komentarz” do międzyosobniczych różnic w wynikach dotyczących topologii chromosomu Y w plemnikach mężczyzn z grupy kontrolnej (inspiracja: wyniki z tabeli 29. dotyczące chromosomu Y).

Fig. 26. „Profitable localization”, that is a „comment” to intraindividual differences in the results concerning the topology of chromosome Y in sperm nuclei of men from control group (inspiration: results from table 29 concerning chromosome Y).

VI. PODSUMOWANIE WYNIKÓW

Związek kariotypu z funkcją plemnika

– Zdolność plemników do ksenogenicznej penetracji oocytów *in vitro* jest upośledzona u około połowy pacjentów z obniżonymi parametrami nasienia, jednak bez związku z określoną wadą nasienia.

– Zdolność plemników do ksenogenicznej penetracji oocytów *in vitro* jest upośledzona w niewielkim stopniu przez obecność heteromorfizmów chromosomów, jednak bez związku z określoną wadą nasienia.

– Zdolność plemników do ksenogenicznej penetracji oocytów *in vitro* nie jest obniżona u większości niepłodnych mężczyzn z normozoospermia.

– Zdolność plemników do ksenogenicznej penetracji oocytów *in vitro* nie jest obniżona przez obecność chromosomów markerowych.

Mitotyczna/mejotyczna niestabilność w spermatogenezie

– W plemnikach mężczyzn z niepowodzeniami rozrodu średnia częstość disomii chromosomów 13, 15, 18, 21 i Y jest podwyższona, a chromosomu X nie, w porównaniu z grupą kontrolną.

– Podwyższona częstość hiperhaploidii chromosomów w plemnikach jest pozytywnie skorelowana z częstością hiperhaploidii w komórkach somatycznych u mężczyzn z niepowodzeniami rozrodu oraz, u niektórych mężczyzn z grupy kontrolnej.

– Średni poziom hiperhaploidii badanych chromosomów w komórkach somatycznych mężczyzn z azoospermia jest ponad 3-krotnie wyższy w porównaniu z grupą kontrolną.

– Korelacja pomiędzy błędami w segregacji chromosomów mitotycznych i mejotycznych wskazuje na zaburzenia w mechanizmie(ach) kontrolującym podziały komórkowe jako na jedną z przyczyn podwyższonego poziomu aneuploidii chromosomów w plemnikach.

Wzory segregacji mejotycznej

– Znajomość wzoru segregacji mejotycznej w plemnikach nosiciela translokacji chromosomowej wzajemnej jest w przypadku braku danych rodowodowych przydatna do oceny prawdopodobieństwa posiadania potomstwa bez wad.

– Segregacja mejotyczna u nosicieli rodzinnej translokacji wzajemnej (syna i ojca) przebiega podobnie.

– U pacjenta z niskoprocentowym mozaicyzmem chromosomu markerowego w komórkach somatycznych możliwa jest jego kilkukrotna kumulacja w tkance gametogenicznej.

Topologia chromosomów w plemniku

– Topologia chromosomów w jądrze komórkowym plemnika ulega zmianie w wyniku nieprawidłowej mejozy, typowej dla nosicieli translokacji chromosomowych wzajemnych lub objawiającej się podwyższonym poziomem aneuploidii.

– Konformacja „wsuwki do włosów” cechuje w plemniku również chromosom Y, którego telomery (p oraz q) mogą tworzyć dimery.

– W wyodrębnionym obszarze chromocentrum lokalizacja centromeru chromosomu Y jest losowa.



VII. PIŚMIENNICTWO

1. de Kretser D.M.: Male infertility. *Lancet*, 1997, 349, 787-790.
2. Healy D., Trounson A., Andersen A.: Female infertility: causes and treatment. *Lancet*, 1994, 343, 1539-44.
3. Lipshultz L.I., Howard S.S.: Infertility in the Male. St. Louis, USA, Mosby-Year Book Inc., 1997.
4. Ferlin A., Raicu F., Gatta V. et al.: Male infertility: role of genetic background. *Reprod. Biomed. Online*, 2007, 14, 734-745.
5. Ainsworth C.: The secret life of sperm. *Nature*, 2005, 436, 771-772.
6. Dadoune J.-P.: Spermatozoal RNAs: what about their functions? *Microscopy Res. Techniq.*, 2009, 72, 536-551.
7. Lalancette C., Miller D., Li Y. et al.: Paternal contributions: new functional insights for spermatozoal RNA. *J. Cell Biochem.*, 2008, 104, 1570-1570.
8. Ward M.A., Ward W.S.: A model for the function of sperm DNA degradation. *Reprod. Fertil. Dev.*, 2004, 16, 547-554.
9. Surani M.A.: Reprogramming of genome function through epigenetic inheritance. *Nature*, 2001, 414, 122-128.
10. Mudrak O., Tomilin N., Zalensky A.: Chromosome architecture in the decondensing human sperm nucleus. *J. Cell Sci.*, 2005, 118, 4541-4550.
11. Zalenskaya I., Bradbury E., Zalensky A.O.: Chromatin structure of telomere domain in human sperm. *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, 2000, 279, 213-218.
12. Zalensky A.O., Siino J.S., Gineitis A.A. et al.: Human testis/sperm specific histone H2B (hTSH2B). Molecular cloning and characterization. *J. Biol. Chem.*, 2002, 277, 43474-43480.
13. Claussen U.: Chromosomics. *Cytogenet. Genome Res.*, 2005, 111, 101-106.
14. Cremer T., Cremer C.: Chromosome territories, nuclear architecture and gene regulation in mammalian cells. *Nat. Rev. Genet.*, 2001, 2, 292-301.

15. Cremer T., Kupper K., Dietzel S. et al.: Higher order chromatin architecture in the cell nucleus: on the way from structure to function. *Biol. Cell.*, 2004; 96, 555-567.
16. Foster A.H., Bridger J.M.: The genome and the nucleus: a marriage made by evolution. Genome organization and nuclear architecture. *Chromosoma*, 2005, 30, 1-18.
17. Gasser S.M.: Visualizing chromatin dynamics in interphase nuclei. *Science*, 2002, 24, 1412-1416.
18. Taddei A., Hediger F., Neuman F.R. et al.: The function of nuclear architecture: a genetic approach. *Annu. Rev. Genet.*, 2004, 38, 305-345.
19. Horn P.J., Peterson C.I.: Chromatin higher order folding: wrapping up transcription. *Science*, 2002, 297, 1824-1827.
20. Ward W.S., Zalensky A.: The unique, complex organization of the transcriptionally silent sperm chromatin. *Crit. Rev. Eukaryotic Gene Expression*, 1996, 6, 139-148.
21. Szczygieł M., Kurpisz M.: Struktura plemnikowego DNA ssaków. *Post. Biol. Kom.*, 1996, 23, 211-219.
22. Meistrich M.L., Trostle-Weige P.K., Lin R. et al.: Highly acetylated H4 is associated with histone displacement in rat spermatids. *Mol. Reprod. Dev.*, 1992, 31, 170-181.
23. Lahn B.T., Tang Z.L., Zhou J. et al.: Previously uncharacterized histone acetyltransferases implicated in mammalian spermatogenesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 2002, 99, 8707-8712.
24. Jason L.J.M., Moore S.C., Lewis J.D. et al.: Histone ubiquitination: a tagging tail unfold? *Bioessays*, 2002, 24, 166-174.
25. Kramer J.A., Krawetz S.A.: Nuclear matrix interactions within the sperm genome. *J. Biol. Chem.*, 1996; 271, 11619-11622.
26. Martins R.P., Ostermeier G.C., Krawetz S.A.: Nuclear matrix interactions at the human protamine domain: a working model of potentiation. *J. Biol. Chem.*, 2004, 279, 51862-51868.
27. Meistrich M.L., Mohapatra B., Shirley C.R. et al.: Roles of transition proteins in spermiogenesis. *Chromosoma*, 2003, 111, 483-488.
28. Aoki V.W., Carrell D.T.: Human protamines and the developing spermatids: their structure, function, expression and relationship with male infertility. *Asian J. Androl.*, 2003, 5, 315-324.
29. Oliva R., Dixon G.H.: Vertebrate protamine genes and the histone-to-protamine replacement reaction. *Progr. Nucleic Acid Res. Mol. Biol.*, 1991, 40, 25-94.
30. Bellve A., McKay D., Renzuax B. et al.: Purification and characterization of mouse protamines P1 and P2. Amino acid sequence of P2. *Biochemistry*, 1988, 27, 2890-2897.
31. McKay D., Renzuax B., Dixon G.: Human sperm protamines. Amino-acid sequences of two forms of protamine P2. *Eur. J. Biochem.*, 1986, 156, 5-8.
32. Pirhonen A., Valtonene P., Linnala-Kankuunen A. et al.: Primary structures of two protamine 24variants (St2a and St2b) from stallion spermatozoa. *Biochim. Biophys. Acta*, 1990, 1039, 177-180.
33. Bench G.S., Friz A.M., Corzett M.H. et al.: DNA and total protamine masses in individual sperm from fertile mammalian subjects. *Cytometry*, 1996, 23, 263-271.
34. Lewis J.D., Saper N., Song Y. et al.: Histone H1 and the origin of protamines. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 2004, 101, 4148-4152.
35. Oliva R.: Protamines and male infertility. *Hum. Reprod. Up.*, 2006, 12, 417-435.
36. Pogany G.C., Corzett M., Weston S. et al.: DNA and protein content of mouse sperm. *Exp. Cell Res.*, 1981, 136, 127-136.
37. Carrell D.T., Emery B.R., Hammoud S. et al.: The aetiology of sperm protamine abnormalities and their potential impact on the sperm epigenome. *Int. J. Androl.*, 2008, 31, 537-545.
38. Aoki V.W., Emery B.R., Liu L. et al.: Protamine levels vary between individual sperm cells of infertile human males and correlate with viability and DNA integrity. *J. Androl.*, 2006, 27, 890-898.
39. Carrell D.T., Emery B.R., Hammoud S. et al.: Altered protamine expression and diminished spermatogenesis: what is the link? *Hum. Reprod. Up.*, 2007, 13, 313-327.
40. Gazquez C., Oriola J., de Mateo S. et al.: A common protamine 1 promoter polymorphism (-190 C->A) correlates with abnormal sperm morphology and increased protamine P1/P2 ratio in infertile patients. *J. Androl.*, 2008, 29, 540-548.
41. Hammoud S., Emery B.R., Aoki V.W. et al.: Identification of genetic variation in the 5' and 3' non-coding regions of the protamine genes in patients with protamine deregulation. *Arch. Androl.*, 2007, 53, 267-274.
42. Ramos L., van der Heijden G.W., Derijck A. et al.: Incomplete nuclear transformation of human spermatozoa in oligo-astheno-teratozoospermia: characterization by indirect immunofluorescence of chromatin and thiol status. *Hum. Reprod.*, 2008, 23, 259-70.
43. Mylonis I., Drosou V., Brancorsini S. et al.: Temporal association of protamine 1 with the inner nuclear membrane protein lamin B receptor during spermiogenesis. *J. Biol. Chem.*, 2004, 279, 11626-11631.
44. Papoutsopoulou S., Nikolakakai E., Chalepakis G. et al.: SR protein-specific kinase 1 is highly expressed in testis and phosphorylates protamine 1. *Nucleic Acids Res.*, 1999, 27, 2972-2980.
45. Watson J.M., Meyne J., Marshall-Graves J.A.: Ordered tandem arrangement of chromosomes in sperm heads of monotreme mammals. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 1996, 93, 10200-10.
46. Balhorn R., Cosman M., Thornton K.: Protamine mediated condensation of DNA in mammalian sperm. The Male Gamete. W Basic Science to Clinical Application. C. Gagnon, Ed. (Cache River Press, Vienna, IL), 1999, 55-70.
47. Fuentes-Mascorro G., Serrano H., Rosado A.: Sperm chromatin. *Arch. Androl.*, 2000, 45, 215-225
48. Prieto M.C., Maki A.H., Balhorn R.: Analysis of DNA-protamine interactions by optical detection of magnetic resonance. *Biochemistry*, 1997, 36, 11944-11951.
49. D'auria G., Paolillo L., Sartorio R. et al.: Structure and function of protamines and nuclear magnetic resonance investigation of the interaction of cupleines with mono-nucleotides. *Biochem. Biophys. Acta*, 1993, 1162, 209-216.
50. Bianchi F., Roussequx-Prevost R., Bailly C. et al.: Interaction of human P1 and P2 protamines with DNA. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 1994, 201, 1197-1204.
51. Balhorn R.: A model for the structure of chromatin in mammalian sperm. *J. Cell Biol.*, 1982, 93, 298-305.
52. Braun R.E.: Packaging paternal chromosomes with protamine. *Nat. Genet.*, 2001, 28, 10-12.
53. Hud N.V., Allen M.J., Downing K.H. et al.: Identification of the elementary packing unit of DNA in mammalian sperm cells by atomic force microscopy. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 1993; 193, 1347-1354.

54. Hud N.V., Vilfan I.D.: Toroidal DNA condensates: unraveling the fine structure and the role of nucleation in determining size. *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.*, 2005; 34, 295-318.
55. Brewer L.R., Corzett M., Balhorn R. et al.: Protamine-induced condensation and decondensation of the same DNA molecule. *Science*, 1999, 2, 120-123.
56. Hecht N.B.: Regulation of 'haploid expressed genes' in male germ cells. *J. Reprod. Fertil.*, 1990, 88, 679-93.
57. Oliva R., Dixon G.H.: Vertebrate protamine gene evolution I. Sequence alignments and gene structure. *J. Mol. Evol.*, 1990, 30, 333-346.
58. Doenecke D., Drabent B., Bode C. et al.: Histone gene expression and chromatin structure during spermatogenesis. *Adv. Exp. Med. Biol.*, 1997, 424, 37-48.
59. Gatewood J.M., Cook G.R., Balhorn R. et al.: Sequence-specific packaging of DNA in human sperm chromatin. *Science*, 1987, 236, 962-964.
60. Kimmins S., Sassone-Corsi P.: Chromatin remodelling and epigenetic features of germ cells. *Nature*, 2005, 434, 583-589.
61. Churikov D., Zalenskaya I.A., Zalensky A.: Male germline-specific histones in mouse and man. *Cytogenet. Genome Res.*, 2004, 105, 203-214.
62. Lewis J.D., Abbott D.W., Ausio J.: A haploid affair: core histone transitions during spermatogenesis. *Biochem. Cell Biol.*, 2003; 81, 131-140.
63. Bramlage B., Kosciessa U., Doenecke D. et al.: Differential expression of the murine histone genes H3.3A and H3.3B. *Differentiation*, 1997, 62, 13-20.
64. Van Hooser A.A., Ouspenski I.I., Gregson H.C. et al.: Specification of kinetochore-forming chromatin by the histone H3 variant CENP-A. *J. Cell Sci.*, 2001, 114, 3529-3542.
65. Zalensky A.O., Brenemear J.W., Zalenskaya I. et al.: Organization of centromeres in the decondensed nuclei of mature human sperm. *Chromosoma*, 1993, 102, 509-518.
66. Martianov I., Brancorsini S., Gansmuler A. et al.: Distinct functions of TBP and TLF/TRF2 during spermatogenesis: requirement of TLF for heterochromatic chromocenter formation in haploid round spermatids. *Development*, 2002, 129, 945-955.
67. Tanaka H., Iguchi N., Isotani A. et al.: HANP1/HIT2, a novel histone H1-like protein involved in nuclear formation and sperm fertility. *Mol. Cell Biol.*, 2005, 25, 7107-7119.
68. Yan W., Ma I., Burns K.H. et al.: HILS1 is a spermatid-specific linker histone H1-like protein implicated in chromatin remodeling during spermiogenesis. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 2003, 100, 10546-10551.
69. Wykes S.M., Krawetz A.: The structure organization of sperm chromatin. *J. Biol. Chem.*, 2003, 278, 29471-29477.
70. Hammound S.S., Nix D.A., Zhang H. et al.: Distinctive chromatin in human sperm packages for embryo development. *Nature*, 2009, 460, 4730478.
71. Gineitis A.A., Zalenskaya I.A., Yau P.M. et al.: Human sperm telomere-binding complex involves histone H2B and secures telomere membrane attachment. *J. Cell. Biol.*, 2000, 151, 1591-1598.
72. Wu J., Ribar T., Cummings D.E. et al.: Spermiogenesis and exchange of basic nuclear proteins are impaired in male germ cells lacking Camk4. *Nat. Genet.*, 2000, 25, 448-2.
73. Arpanahi A., Brinkworth M., Iles D. et al.: Endonuclease-sensitive regions of human spermatozoal chromatin are highly enriched in promoter and CTCF binding sequences. *Genome Res.*, 2009, 19, 1338-1349.
74. Pittoggii C., Renzi L., Zaccagnini G. et al.: A fraction of mouse sperm chromatin is organized in nucleosomal hypersensitive domains enriched in retroposon DNA. *J. Cell Sci.*, 1999, 112, 3537-48.
75. Sotolongo B., Huang T.T.F., Iseberger E. et al.: An endogenous nuclease in hamster, mouse, and human spermatozoa cleaves DNA into loop-sized fragments. *J. Androl.*, 2005, 26, 272-280.
76. Zalensky A., Zalenskaya I.: Organization of chromosomes in spermatozoa: an additional layer of epigenetic information? *Biochem. Soc. Trans.*, 2007, 35, 609-611.
77. Banerjee S., Smallwood A., Banerjee S. et al.: Chromatin modification of imprinted H19 gene in mammalian spermatozoa. *Mol. Reprod. Dev.*, 1998; 50, 474-484.
78. Gardiner-Garden M., Ballesteros M., Gordon M. et al.: Histone- and protamine-DNA association: conservation of different patterns within the beta-globin domain in human sperm. *Mol. Cell Biol.*, 1998, 18, 3350-3356.
79. Barone J.G., De Lara J., Cummings K.B. et al.: DNA organization in human spermatozoa. *J. Androl.*; 1994, 15, 139-144.
80. Ward W.S., Kishikawa H., Akutsu H. et al.: Further evidence that sperm nuclear proteins are necessary for embryogenesis. *Zygote*, 2000, 8, 51-56.
81. Klaus A.V., McCarrey J.R., Farkas A. et al.: Changes in DNA loop domain structure during spermatogenesis and embryogenesis in the Syrian golden hamster. *Biol. Reprod.*, 2001, 64, 1297-1306.
82. Nadel B., de Lara J., Finkernagel S.W. et al.: Cell-specific organization of the 5S ribosomal RNA gene cluster DNA loop domains in spermatozoa and somatic cells. *Biol. Reprod.*, 1995, 53, 1222-1228.
83. Kalandadze A., Bushara S.A., Vassetzky Y.S. Jr. et al.: Characterization of DNA pattern in the site of permanent attachment to the nuclear matrix located in the vicinity of replication origin. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 1990, 168, 9-15.
84. Schmid C., Heng H.H., Rutin C. et al.: Sperm nuclear matrix association of the prml1-prm2-tmp2 domain is independent of alu methylation. *Mol. Hum. Reprod.*, 2001, 7, 903-911.
85. Ward W.S.: Deoxyribonucleic acid loop domain tertiary structure in mammalian spermatozoa. *Biol. Reprod.*, 1993, 48, 1193-1201.
86. Solov'eva L., Svetlova M., Bodinski D. et al.: Nature of telomere dimers and chromosome looping in human spermatozoa. *Chromosome Res.*, 2004, 12, 817-823.
87. Sotolongo B., Lino E., Ward W.S.: Ability of hamster spermatozoa to digest their own DNA. *Biol. Reprod.*, 2003, 69, 2029-35.
88. Mohar I., Szczygiel M.A., Yanagimachi R. et al.: Sperm nuclear halos can transform into normal chromosomes after injection into oocytes. *Mol. Reprod. Dev.*, 2002, 62, 416-420.
89. Sotolongo B., Ward W.S.: DNA loop domain organization: the three dimensional code. *J. Cell Biochem. Suppl.*, 2000, 35, 23-26.
90. Ward W.S.: Function of sperm chromatin structural elements in fertilization and development. *Mol. Hum. Reprod.*, 2010, 16, 30-36.

91. Ankem M.K., Mayer E., Ward W.S. et al.: Novel assay for determining DNA organization in human spermatozoa: implications for male factor infertility. *Urology*, 2002, 59, 575-578.
92. Zalenskaya I.A., Zalensky A.O.: Non-random positioning of chromosomes in human sperm nuclei. *Chromosome Res.*, 2004, 12, 163-173.
93. Hoyer-Fender S., Singh P.B., Motzkus D.: The murine heterochromatin protein M31 is associated with the chromocenter in round spermatids and is a component of mature spermatozoa. *Exp. Cell Res.*, 2000, 254, 72-79.
94. Zalensky A., Zalenskaya I.: Telomeres in mammalian male germline cells. *Int. Rev. Cytol.*, 2002, 218, 37-67.
95. Haaf T., Ward D.C.: Higher order nuclear structure in mammalian sperm revealed by in situ hybridization and extended chromatin fibers. *Exp. Cell Res.*, 1995, 219, 604-611.
96. Schultz R.M., Worrall D.M.: Role of chromatin structure in zygotic gene activation in the mammalian embryo. *Semin. Cell Biol.*, 1995, 6, 201-208.
97. Wiland E., Żegała M., Kurpisz M.: Topologia chromosomów w jądrze komórkowym. Plemniki. Część 2. *Postępy Hig. Med. Dośw.* (online), 2006, 60, 343-351.
98. Manvelyan M., Hunstig F., Bhatt S. et al.: Chromosome distribution in human sperm – a 3D multicolor banding-study. *Mol. Cytogenet.*, 2008, 1, 25.
99. Luetjens C.M., Payne C., Schatten G.: Non-random chromosome positioning in human sperm and sex chromosome anomalies following intracytoplasmic sperm injection. *Lancet*, 1999, 353, 1240.
100. Hazzouri M., Rousseaux S., Mongelard F. et al.: Genome organization in the human sperm nucleus studies by FISH and confocal microscopy. *Mol. Reprod. Dev.*, 2000, 55, 307-315.
101. Gurevitch M., Amiel A., Ben-Zion M. et al.: Acrocentric centromere organization within the chromocenter of the human sperm nucleus. *Mol. Reprod. Develop.*, 2001, 60, 507-516.
102. Greaves I.K., Svartman M., Wakefield M. et al.: Chromosome painting detects non-random chromosome arrangement in dasyurid marsupial sperm. *Chromosome Res.*, 2001, 9, 251-259.
103. Greaves I.K., Rens W., Ferguson-Smith M.A. et al.: Conservation of chromosome arrangement and position of the X in mammalian sperm suggest functional significance. *Chromosome Res.*, 2003, 11, 503-512.
104. Tsend-Ayush E., Dodge N., Mohr J. et al.: Higher-order genome organization in platypus and chicken sperm and repositioning of sex chromosomes during mammalian evolution. *Chromosoma*, 2008, 118, 53-69.
105. Ward W.S., Partin A.W., Coffey D.S.: DNA loop domains in mammalian spermatozoa. *Chromosoma*, 1989, 98, 153-159.
106. Terada Y., Luetjens C.M., Sutovsky P. et al.: Atypical decondensation of the sperm nucleus, delayed replication of the male genome, and sex chromosome positioning following intracytoplasmic human sperm injection (ICSI) into golden hamster eggs: Does ICSI itself introduce chromosomal anomalies? *Fertil. Steril.*, 2000, 74, 454-460.
107. Foster H., Abeydeera L.R., Griffin D.K. et al.: Non-random chromosome positioning in mammalian sperm nuclei, with migration of the sex chromosomes during late spermatogenesis. *J. Cell Sci.*, 2005, 118, 1811-1820.
108. Meyer-Ficca M., Muller-Navia J., Scherthan H.: Clustering of pericentromeres initiates in step 9 of spermiogenesis of the rat (*Rattus norvegicus*) and contributes to a well defined genome architecture in the sperm nucleus. *J. Cell Sci.*, 1998, 111, 1363-1370.
109. Solovei I.V., Joffe B.J., Hori T. et al.: Unordered arrangement of chromosomes in the nuclei of chicken spermatozoa. *Chromosoma*, 1998, 107, 184-188.
110. Mau-Holzmann U.A.: Somatic chromosomal abnormalities in infertile men and women. *Cytogenet. Genome Res.*, 2005, 111, 317-336.
111. Martin R.H.: Cytogenetic determinants of male fertility. *Hum. Reprod. Update*, 2008, 14, 379-390.
112. De Braekeleer M., Dao T.: Cytogenetic studies in male infertility: a review. *Hum. Reprod.*, 1991, 6, 245-50.
113. Guichaoua M.R., Delafontaine D., Noel B. et al.: Male infertility of chromosomal origin. *Contracept. Fertil. Sex.*, 1993, 21, 113-121.
114. Pandiyan N., Jequier M.A.: Mitotic chromosomal anomalies among 1210 infertile men. *Hum. Reprod.*, 1996, 11, 2604-2608.
115. Bonduelle M., Van Assche E., Joris H. et al.: Prenatal testing in ICSI pregnancies: incidence of chromosomal anomalies in 1586 karyotypes and relation to sperm parameters. *Hum. Reprod.*, 2002, 17, 2600-2614.
116. Gekas J., Thepot F., Turleau C. et al.: Chromosomal factors of infertility in candidate couples for ICSI: an equal risk of constitutional aberrations in women and men. *Hum. Reprod.*, 2001, 16, 82-90.
117. Sun F., Ko E., Martin R.H.: Is there a relationship between sperm chromosome abnormalities and sperm morphology? *Reprod. Biol. Endocrinol.*, 2006, 25, 4, 1 (www.rbej.com).
118. Salahshourifar I., Shahrokshahi N., Tavakolzadeh Z. et al.: Complex chromosomal rearrangement involving chromosomes 1, 4 and 22 in an infertile male: case report and literature review. *J. Appl. Genet.*, 2009, 50, 69-72.
119. Blanco J., Farreras A., Egozcue J. et al.: Meiotic behavior of the sex chromosomes in a 45,X/46,Xr(Y)/46,X,dic r(Y) patient whose semen was assessed by fluorescence in situ hybridization. *Fertil. Steril.*, 2003, 79, 913-918.
120. Dallapiccola B., De Filippis V., Notarangelo A. et al.: Ring chromosome 21 in healthy persons: different consequences in females and in males. *Hum. Genet.*, 1986, 73, 218-220.
121. Hammoud I., Gomes D.M., Bergere M. et al.: Sperm chromosome analysis of an infertile patient with a 95% mosaic r(21) karyotype and normal phenotype. *Fertil. Steril.*, 2009, 91, 930.e13-15.
122. Huret J.L., Leonard C., Kanoui V.: Ring chromosome 21 in a phenotypically normal but infertile man. *Clin. Genet.*, 1985, 28, 541-545.
123. Martin J.R., World A., Taylor H.S.: Ring chromosome 12 and severe oligospermia: a case report. *Fertil. Steril.*, 2008, 90, 443e13-5.
124. Moreau N., Teyssier M.: Ring chromosome 15: report of a case in an infertile man. *Clin. Genet.*, 1982, 21, 272-279.
125. Rao K.L., Babu K.A., Kanakavali M.D.K. et al.: Prevalence of chromosome defects in azoospermic and oligoasthenoteratozoospermic South Indian infertile men attending an infertility clinic. *Reprod. Biomed. Online*, 2005, 10, 467-472.

126. Hwang S.H., Lee S.M., Seo E.J. et al.: A case of male infertility with a reciprocal translocation t(X;14)(p11.4;p12). *Korea J. Lab.*, 2007, 27, 139-142.
127. Perrin A., Douet-Guilbert N., Le Bris M.J. et al.: Segregation of chromosomes in sperm of a t(X;18)(q11;p11.1) carrier inherited from his mother: case report. *Hum. Reprod.*, 2008, 23, 227-230.
128. Barczyk A.: Cytogenetyka męskiej gametogenezy. Część 1. Translokacje wzajemne. *Post. Biol. Kom.*, 1995, 22, 113-129.
129. Brisset S., Izard V., Misrahi M. Cytogenetic, molecular and testicular tissue studies in an infertile 45,X male carrying an unbalanced (y;22) translocation: case report. *Hum. Reprod.*, 2005, 20, 2168-2172.
130. Giltay J.C., Kastrop P.M.M., Tiemessen C.H.J. et al.: Sperm analysis in a subfertile male with a Y;16 translocation, using four-color FISH. *Cytogenet. Cell Genet.*, 1999, 84, 67-72.
131. Alves C., Carvalho F., Cremades N. et al.: Unique (Y;13) translocation in a male with oligozoospermia: cytogenetic and molecular studies. *Eur. J. Hum. Genet.*, 2002, 10, 467-474.
132. Hsu L.Y.: Phenotype/karyotype correlations of Y chromosome aneuploidy with emphasis on structural aberrations in postnatally diagnosed cases. *Am. J. Med. Genet.*, 1994, 53, 108-140.
133. Pinho M.J., Neves R., Costa P. et al.: Unique t(y;1)(q12;q12) reciprocal translocation with loss of the heterochromatic region of chromosome 1 in a male with azoospermia due to meiotic arrest: a case report. *Hum. Reprod.*, 2005, 20, 689-696.
134. Yamada K., Nanko S., Hattori S. et al.: Cytogenetic studies in Y – to – X translocation observed in three members of one family, with evidence of infertility in amle carriers. *Hum. Genet.*, 1982, 60, 85-90.
135. Morel F., Fellmann F., Roux C. et al.: Meiotic segregation analysis by FISH investigation of spermatozoa of a 46,Y,der(X),t(X,Y)(qter-->p22::q11-->qter) carrier. *Cytogenet. Cell Genet.*, 2001, 92, 63-8.
136. Chagnon P., Schneider R., Hebert J. et al.: Identification and characterization of an Xp22.33;Yp11.2 translocation causing a triplication of several genes of the pseudo-autosomal region 1 in an XX male patient with severe systemic lupus erythromatosus. *Arthritis Rheum.*, 2006, 54, 1270-1278.
137. DesGroseilliers M., Fortin F., Lemyre E. et al.: Complex mosaicism in sex reversed SRY⁺ male twins. *Cytogenet. Genome Res.*, 2006, 112, 176-179.
138. Ergun-Longmire B., Vinci G., Alonso L. et al.: Clinical, hormonal and cytogenetic evaluation of 46,XX males and review of the literature. *J. Pediatr. Endocrinol. Metab.*, 2005, 18, 739-748.
139. Rajender S., Rajani V., Gupta N.J. et al.: SRY-negative 46,XX male with normal genitals, complete masculinization and infertility. *Mol. Hum. Reprod.*, 2006, 12, 341-346.
140. Butler M.G., Sanger W.G., Walzak M.O. et al.: A unique Y/Y translocation in an infertile male. *Cytogenet. Cell Genet.*, 1981, 31, 175-177.
141. Haaf T., Schmid M.: Y isochromosome associated with a mosaic karyotype and inactivation of the centromere. *Hum. Genet.*, 1990, 85, 486-490.
142. Tiepolo F., Zuffardi O.: Localization of factors controlling spermatogenesis in the nonfluorescent portion of the human Y chromosome long arm. *Hum. Genet.*, 1976, 34, 119-124.
143. Foresta C., Moro E., Ferlin A.: Y chromosome microdeletions and alterations of spermatogenesis. *Endocrine Rev.*, 2001, 22, 226-239.
144. Vogt P.H., Edelmann A., Kirsch S. et al.: Human Y chromosome azoospermia factors (AZF) mapped to different subregions in Yq11. *Hum. Mol. Genet.*, 1996, 5, 933-943.
145. Perrin J., Metzler-Guillemain C., Karsenty G. et al.: Meiotic arrest at the midpachytene stage in a patient with complete azoospermia factor b deletion of the Y chromosome. *Fertil. Steril.*, 2006, 85, 494.e5-8.
146. Repping S., Skaletsky H., Lange G. et al.: Recombination between palindromes P5 and P1 on the human Y chromosome causes massive deletions and spermatogenic failure. *Am. J. Hum. Genet.*, 2002, 71, 906-922.
147. Jaruzelska J., Korcz A., Wojda A. et al.: Mosaicism for 45,X cell line may accentuate the severity of spermatogenesis defects in men with AZFc deletion. *J. Med. Genet.*, 2001, 38, 798-802.
148. Siffroi J.P., Le Bourhis C., Krausz C. et al.: Sex chromosome mosaicism in males carrying Y chromosome long arm deletions. *Hum. Reprod.*, 2000, 15, 2559-2562.
149. Ferlin A., Garolla A., Foresta C.: Chromosome abnormalities in sperm of individuals with constitutional sex chromosomal abnormalities. *Cytogenet. Genome Res.*, 2005, 111, 310-316.
150. Vogt P.H.: Genomic heterogeneity and instability of the AZF locus on the human Y chromosome. *Mol. Cell Endocrinol.*, 2004, 224, 1-7.
151. Ferlin A., Arredi B., Speltra E. et al.: Molecular and clinical characterization of Y chromosome microdeletions in infertile men: a 10-year experience in Italy. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 2007, 92, 762-770.
152. Hellani A., Al-Hassan S., Al-Durairhim A. et al.: Y chromosome microdeletions: are they implicated in teratozoospermia? *Hum. Reprod.*, 2005, 20, 3505-3509.
153. Templado C., Bosch M., Benet J.: Frequency and distribution of chromosome abnormalities in human spermatozoa. *Cytogenet. Genome Res.*, 2005, 111, 199-205.
154. Buwe A., Guttenbach M., Schmid M. et al.: Effect of paternal age on the frequency of cytogenetic abnormalities in human spermatozoa. *Cytogenet. Genome Res.*, 2005, 111, 213-228.
155. Hassold T., Hunt P.: To err(meiotically) in humans: the genesis of human aneuploidy. *Nat. Rev. Genet.*, 2001, 2, 280-291.
156. Zaragoza M.V., Surti U., Redline R.W. et al.: Parental origin and phenotype of triploidy in spontaneous abortions: predominance of diandry and association with the partial hydatidiform mole. *Am. J. Hum. Genet.*, 2000, 66, 1807-1820.
157. Olson S.D., Magenis R.E.: Preferential paternal origin of the de novo structural rearrangements. Daniel A (ed): *The cytogenetics of mammalian autosomal rearrangements*. (Alan R. Liss. New York), 1988, 583-599.
158. Martin R.H.: Mechanisms of nondisjunction in human spermatogenesis. *Cytogenet. Genome Res.*, 2005, 111, 245-249.
159. Shi Q., Spriggs E., Field L. et al.: Single sperm typing demonstrates that reduced recombination is associated with the production of aneuploid 24,XY human sperm. *Am. J. Med. Genet.*, 2001, 99, 34-38.

160. Martin R.H., Greene C., Rademaker A. et al.: Analysis of aneuploidy in spermatozoa from testicular biopsies from men with nonobstructive azoospermia. *J. Androl.*, 2003a, 24, 100-103.
161. Sun F., Trpkov K., Rademaker A. et al.: Variation in meiotic recombination frequencies among human males. *Hum. Genet.*, 2005, 116, 172-178.
162. Codina-Pascual M., Campillo M., Kraus J. et al.: Crossover frequency and synaptonemal complex length: their variability and effects on human male meiosis. *Mol. Hum. Reprod.*, 2006, 12, 123-133.
163. Lamb N.E., Sherman S.L., Hassold T.J.: Effect of meiotic recombination on the production of aneuploid gametes in humans. *Cytogenet. Genome Res.*, 2005, 111, 250-255.
164. Sun F., Oliver-Bonet M., Liehr T. et al.: Human male recombination maps for individual chromosomes. *Am. J. Hum. Genet.*, 2004, 74, 521-531.
165. Sun F., Oliver-Bonet M., Liehr T. et al.: Variation in MLH1 distribution in recombination maps for individual chromosomes from human males. *Hum. Mol. Genet.*, 2006, 15, 2376-2391.
166. Sun F., Oliver-Bonet M., Liehr T. et al.: Analysis of non-crossover bivalents in pachytene cells from 10 normal men. *Hum. Reprod.*, 2006, 21, 2335-2339.
167. Sherman S.L., Freeman S.B., Allen E.G. et al.: Risk factors for nondisjunction of trisomy 21. *Cytogenetic Genome Res.*, 2005, 111, 273-280.
168. Ferguson K.A., Wong E.C., Chow V. et al.: Abnormal meiotic recombination in infertile men and its association with sperm aneuploidy. *Hum. Mol. Genet.*, 2007, 16, 2870-2879.
169. Savage A.R., Petersen M.B., Pettay D. et al.: Elucidating the mechanisms of paternal non-disjunction of chromosome 21 in humans. *Hum. Mol. Genet.*, 1998, 7, 1221-1227.
170. Sun F., Turek P., Greene C. et al.: Abnormal progression through meiosis in men with nonobstructive azoospermia. *Fertil Steril.*, 2007, 87, 565-571.
171. Laurie D., Hulten M.: Further studies on chiasma distribution and interference in the human male. *Ann. Hum. Genet.*, 1985, 49, 203-214.
172. Fisher-Lindahl K.: His and hers recombinational hotspots. *Trends Genet.*, 1991, 7, 273-276.
173. Robinson W.P.: The extent, mechanism, and consequences of genetic variation, for recombination rate. *Am. J. Hum. Genet.*, 1996, 59, 1175-1183.
174. Gonsalves J., Sun F., Schlegel P.N. et al.: Defective recombination in infertile men. *Hum. Mol. Genet.*, 2004, 13, 2875-2883.
175. Sun F., Mikhaail-Philips M., Oliver-Bonet M. et al.: The relationship between meiotic recombination in human spermatocytes and aneuploidy in sperm. *Hum. Reprod.*, 2008, 23, 1691-1697.
176. Sciarano R.B., Rahn M.I., Pigozzi M.I. et al.: An azoospermic man with a double-strand DNA break-processing deficiency in then spermatocyte nuclei: Case report. *Hum. Reprod.*, 2006, 21, 1194-1203.
177. Egozcue J., Sarrate Z., Codina-Pascual M. et al.: Meiotic abnormalities in infertile males. *Cytogenet. Genome Res.*, 2005, 111, 337-342.
178. Rudak E., Jacobs P.A., Yanagimachi R.: Direct analysis of the chromosome constitution of human spermatozoa. *Nature*, 1978, 274, 911-913.
179. Ogawa S., Araki S., Araki Y. et al.: Chromosome analysis of human spermatozoa from an oligoasthenozoospermic carrier for a 13;14 Robertsonian translocation by their injection into mouse oocytes. *Hum. Reprod.*, 2000, 15, 1136-1139.
180. Oliver-Bonet M., Benet J., Martin R.H.: Studying meiosis: a review of FISH and M-FISH techniques used in the analysis of meiotic processes in humans. *Cytogenet. Genome Res.*, 2006, 114, 312-318.
181. Brandriff B.F., Gordon L., Ashworth L. et al.: Chromosomes of human sperm: variability among normal individuals. *Hum. Genet.*, 1985, 70, 18-24.
182. Estop A.M., Ciepły K., Van Kirk V. et al.: Cytogenetic studies in human sperm. *Hum. Genet.*, 1991, 87, 447-451.
183. Kamiguchi Y., Mikamo K.: An improved, efficient method for analyzing human sperm chromosomes using zona-free hamster ova. *Am. J. Hum. Genet.*, 1986, 38, 724-740.
184. Martin R.H., Hildebrand K.A., Yamamoto J. et al.: The meiotic segregation of human sperm chromosomes in two men with accessory marker chromosomes. *Am. J. Med. Genet.*, 1986; 25, 381-388.
185. Pellestor F., Sele B., Jalbert H.: Chromosome analysis of spermatozoa from a male heterozygous for a 13;14 Robertsonian translocation. *Hum. Genet.*, 1987, 76, 116-120.
186. Templado C., Benet J., Genesca A. et al.: Human sperm chromosomes. *Hum Reprod.*, 1988, 3, 133-138.
187. Pellestor F., Girardet A., Coignet L. et al.: Assessment of aneuploidy for chromosomes 8, 9, 13, 16, and 21 in human sperm by using primed in situ labeling technique. *Am. J. Hum. Genet.*, 1996, 58, 797-802.
188. Pellestor F., Imbert I., Andreo B.: Rapid chromosome detection by PRINS in human sperm. *Am. J. Med. Genet.*, 2002, 107, 109-114.
189. Pellestor F., Paulasova P., Andreo B. et al.: Multicolor PRINS and multicolor PNA. *Cytogenet. Genome Res.*, 2006, 114, 263-269.
190. Martin R.H., Balkan W., Burns K., Rademaker A.W. et al.: Direct chromosome analysis of human spermatozoa. *Am. J. Hum. Genet.*, 1982, 77, 108-114.
191. Shi Q., Martin R.H.: Aneuploidy in human sperm: a review of the frequency and distribution of aneuploidy, effects of donor age and lifestyle factors. *Cytogenet. Cell Genet.*, 2000, 90, 219-226.
192. Rubes J., Vozdova M., Robbins W.A. et al.: Stable variants of sperm aneuploidy among healthy men show associations between germinal and somatic aneuploidy. *Am. J. Hum. Genet.*, 2002, 70, 1507-1519.
193. Rubes J., Vozdova M., Oracova E. et al.: Individual variants in the frequency of sperm aneuploidy in humans. *Cytogenet. Genome Res.*, 2005, 111, 229-236.
194. Eskenazi B., Wyrobek A.J., Kidd S.A. et al.: Sperm aneuploidy in fathers of children with paternally and maternally inherited Klinefelter syndrome. *Hum. Reprod.*, 2002, 17, 576-583.
195. Hixon M., Millie E., Judis L.A. et al.: FISH studies of the sperm of fathers of paternally derived cases of trisomy 21: no evidence for an increase in aneuploidy. *Hum. Genet.*, 1998, 103, 654-660.
196. Soares S.R., Templado C., Blanco J. et al.: Numerical chromosome abnormalities in the spermatozoa of the fathers of children with trisomy 21 of paternal origin:

- generalized tendency to meiotic non-disjunction. *Hum. Genet.*, 2001, 108, 134-139.
197. Soares S.R., Vidal F., Bosh M. et al.: Acrocentric chromosome disomy is increased in spermatozoa from fathers of Turner syndrome patient. *Hum. Genet.*, 2001, 108, 499-503.
 198. Robbins W.A., Elashoff D.A., Xun L. et al.: Effect of lifestyle exposures on sperm aneuploidy. *Cytogenet. Genome Res.*, 2005, 111, 371-377.
 199. Tempest H.G., Griffin D.K.: The relationship between male infertility and increased levels of sperm disomy. *Cytogenet. Genome Res.*, 2004, 107, 83-94.
 200. Acar H., Kiline M., Cora T. et al.: Incidence of chromosome 8, 10, X and Y anaploidies in sperm nucleus of infertile men detected by FISH. *Urol. Int.*, 2000, 64, 202-208.
 201. Moosani N., Pattinson H., Carter M. et al.: Chromosomal analysis of sperm from men with idiopathic infertility using sperm karyotyping and fluorescence in situ hybridization. *Fertil. Steril.*, 1995, 64, 811-817.
 202. Calogero A.E., De Palma A., Graziosp C. et al.: Aneuploidy rate in spermatozoa of selected men with abnormal semen parameters. *Hum. Reprod.*, 2001, 16, 1172-1179.
 203. Pang M.G., Kim Y.J., Lee S.H. et al.: The high incidence of meiotic errors increases with decreased sperm count in severe male factor infertilities. *Hum. Reprod.*, 2005, 20, 1688-1694.
 204. Vegetti W., Van Assche E., Frias A. et al.: Correlation between semen parameters and sperm aneuploidy rates investigated by fluorescence in situ hybridization in infertile men. *Hum. Reprod.*, 2000, 15, 351-365.
 205. Nicopoullos J.D., Gilling-Smith C., Almeida P.A. et al.: The role of sperm aneuploidy as a predictor of the success of intracytoplasmic sperm injection? *Hum. Reprod.*, 2005, 23, 240-250.
 206. Martin R.H., Rademaker A.W., Greene C. et al.: A comparison of the frequencies of sperm chromosome abnormalities in men with mild, moderate, and severe oligozoospermia. *Biol. Reprod.*, 2003 b, 69, 535-539.
 207. Miharu N.: Chromosome abnormalities in sperm from infertile men with normal somatic karyotypes: oligozoospermia. *Cytogenet. Genome Res.*, 2005, 111, 347-351.
 208. Bache I., Assche E.V., Cingoz S. et al.: An excess of chromosome 1 breakpoints in male infertility. *Eur. J. Hum. Genet.*, 2004, 12, 993-1000
 209. Schmid T.E., Brinkworth M.H., Hill F. et al.: Detection of structural and numerical chromosomal abnormalities by ACM-FISH analysis in sperm of oligozoospermic infertility patients. *Hum. Reprod.*, 2004, 19, 1395-1400.
 210. Burrello N., Vicari E., Calogero A.E. et al.: Chromosome abnormalities in spermatozoa of patient with azoospermia and normal somatic karyotype. *Cytogenet. Genome Res.*, 2005, 111, 363-365.
 211. Curi S.M., Ariagno J.I., Chenlo P.H. et al.: Asthenozoospermia: analysis of a large population. *Arch. Androl.*, 2003, 49, 343-349.
 212. Hristova R., Ko E., Greene C. et al.: Chromosome abnormalities in sperm from infertile men with asthenoteratozoospermia. *Biol. Reprod.*, 2002, 66, 1781-1783.
 213. Rives N.M.D.: Chromosome abnormalities in sperm from infertile men with normal somatic karyotypes: asthenozoospermia. *Cytogenet. Genome Res.*, 2005, 111, 358-362.
 214. Rives N., Mousset-Simeon N., Mazurier S. et al.: Primary flagellar dyskinesia is associated to an increased rate of spermatozoa aneuploidy. *J. Androl.*, 2005, 26, 61-69.
 215. Machev N., Gosset P., Viville S.: Chromosome abnormalities in sperm from infertile men with normal somatic karyotypes: teratozoospermia. *Cytogenet. Genome Res.*, 2005, 111, 352-357.
 216. Templado C., Hoang T., Greene C. et al.: Aneuploid spermatozoa in infertile men: teratozoospermia. *Mol. Reprod. Dev.*, 2002, 61, 200-204.
 217. Devillard F., Metzler-Guillemain C., Pelletier R. et al.: Polyploidy in large-headed sperm: FISH study of three cases. *Hum. Reprod.*, 2002, 17, 1292-1298.
 218. Lewis-Jones I., Aziz N., Sheshadri S. et al.: Sperm chromosomal abnormalities are linked to sperm morphological deformities. *Fertil. Steril.*, 2003, 79, 212-215.
 219. Perrin A., Morel F., Moy L. et al.: Study of aneuploidy in large-headed, multiple tailed spermatozoa: case report and review of the literature. *Fertil. Steril.*, 2008, 90, 1201.e13-7.
 220. Vicari E., Perdichizzi A., De Palma A. et al.: Globozoospermia is associated with chromatin structure abnormalities: case report. *Hum. Reprod.*, 2002, 17, 2128-2133.
 221. Ferguson K.A., Chow V., Ma S.: Silencing of unpaired meiotic chromosomes and altered recombination patterns in an azoospermic carrier of a t(8;13) reciprocal translocation. *Hum. Reprod.*, 2008, 23, 988-995.
 222. Leng M., Li G., Zhong L. et al.: Abnormal synapsis and recombination in an azoospermic male carrier of a reciprocal translocation t(1;21). *Fertil. Steril.*, 2009, 91, 1293.e17-22.
 223. Oliver-Bonet M., Benet J., Sun F. et al.: Meiotic studies in two human reciprocal translocations and their association with spermatogenic failure. *Hum. Reprod.*, 2005, 20, 683-688.
 224. Oliver-Bonet M., Ko E., Martin R.H.: Male infertility in reciprocal translocation carriers: the sex body affair. *Cytogenet. Genome Res.*, 2005, 111, 343-346.
 225. Pigozzi M.I., Sciarano R.B., Solari A.J.: Changes in crossover distribution along a quadrivalent in a man carrier of a reciprocal translocation t(11;14). *Biocell*, 2005, 29, 195-203.
 226. Midro A.T.: Poradnictwo genetyczne w przypadku nosicielstwa translokacji chromosomowych wzajemnych. *Wiad. Lek.*, 1992, 45, 19-20.
 227. Solari A.J.: Synaptonemal complex analysis in human male fertility. *Eur. J. Histochem.*, 1999, 43, 265-276.
 228. Benet J., Oliver-Bonet M., Cifuentes P. et al.: Segregation of chromosomes in sperm of reciprocal translocation carriers: a review. *Cytogenet. Genome Res.*, 2005, 111, 281-290.
 229. Brugnon F., Van Assche E., Verheyen G. et al.: Study of two markers of apoptosis and meiotic segregation in ejaculated sperm of chromosomal translocation carrier patients. *Hum. Reprod.*, 2006, 21, 685-693.
 230. Perrin A., Caer E., Oliver-Bonet M. et al.: DNA fragmentation and meiotic segregation in sperm of carriers of a chromosomal structural abnormality. *Fertil. Steril.*, 2008, 92, 583-589.

231. Anton E., Vidal F., Blanco J. et al.: Role of sperm FISH studies in the genetic reproductive advice of structural reorganization carriers. *Hum.Reprod.*, 2007, 22, 2088-2092.
232. Anton E., Vidal F., Blanco J. et al.: Reciprocal translocations: tracing their meiotic behavior. *Genet. Med.*, 2008, 10, 730-738.
233. Kekesi A., Erdei E., Torok M. et al.: Segregation of chromosomes in spermatozoa of four hungarian translocation carriers. *Fertil. Steril.*, 2007, 88, 212.e5-11.
234. Anton E., Blanco J., Egozcue J. et al.: Sperm studies in heterozygote inversion carriers: a review. *Cytogenet. Genome Res.*, 2005, 111, 297-304.
235. Morel F., Douet-Guilbert N., Le Bris M.-J. et al.: Meiotic segregation of translocations during male gametogenesis. *Int. J. Androl.*, 2004, 27, 200-212.
236. Midro A.T.: Wpływ nosicielstwa translokacji chromosomowych wzajemnych na potomstwo człowieka. *Post. Biol. Kom.*, 1997, 24, 203-226.
237. Armstrong S.J., Goldman A.S.H., Speed R.M. et al.: Meiotic studies of human male carrier of the common translocation, t(11;22), suggests postzygotic selection rather than preferential 3:1 MI segregation as the cause of liveborn offspring with an unbalanced translocation. *Am. J. Hum. Genet.*, 2000, 67, 601-609.
238. Oliver-Bonet M., Navarro J., Codina-Pascual M. et al.: Meiotic segregation analysis in a t(4;8) carrier: comparison of FISH methods on sperm chromosome metaphase and interphase sperm nuclei. *Eur. J. Hum. Genet.*, 2001, 9, 395-403.
239. Spriggs E.L., Martin R.H., Hulten M.: Sperm chromosome complements from two reciprocal translocation heterozygotes. *Hum. Genet.*, 1992, 88, 447-452.
240. Spriggs E.L., Martin R.H.: Analysis of segregation in a human male reciprocal translocation carrier, t(1;11)(p36.3;q13.1), by two-colour fluorescence in situ hybridization. *Mol. Reprod. Dev.*, 1994, 38, 247-50.
241. Morel F., Douet-Guilbert N., Le Bris M.-J. et al.: Lack of intraindividual variation of unbalanced spermatozoa frequencies from a 46,XY,t(9;22)(q21;q11.2) carrier: Case report. *Hum. Reprod.*, 2004, 19, 2227-2230.
242. Martinez-Pasarell O., Marquez C., Coll M.D. et al.: Analysis of human sperm-derived pronuclei by three-colour fluorescence in-situ hybridization. *Hum. Reprod.*, 1997, 12, 641-645.
243. Vozdova M., Oracova E., Horinova V. et al.: Sperm fluorescence on situ hybridization study of meiotic segregation and an interchromosomal effect in carriers of t(11;18). *Hum.Reprod.*, 2008, 23, 581-588.
244. Martin R.H., Spriggs E.: Sperm chromosome complements in a man heterozygous for a reciprocal translocation 46,XY,t(9;13)(q21.1;q21.2) and a review of the literature. *Clin. Genet.*, 1995, 47, 42-46.
245. Pellestor F., Imbert I., Andreo B. et al.: Study of the occurrence of the interchromosomal effect in spermatozoa of chromosomal rearrangement carriers by fluorescence in situ labelling techniques. *Hum. Reprod.*, 2001, 16, 1155-1164.
246. Rives N., Jamot M., Mousset-Simeon N. et al.: FISH analysis of chromosome segregation and inter-chromosomal effect in spermatozoa of a reciprocal translocation t(9;10)(q11;p11.1) carrier. *J. Hum. Genet.*, 2003, 48, 535-540.
247. Gianaroli L., Magli M.C., Ferraretti A.P. et al.: Possible interchromosomal effect in embryos generated by gametes from translocation carriers. *Hum. Reprod.*, 2002, 17, 3201-3207.
248. Munne S., Escudero T., Fischer J. et al.: Negligible interchromosomal effect in embryos of Robertsonian translocation carriers. *Reprod. Biomed. Online*, 2005, 10, 363-369.
249. Kim S.R., Shaffer L.G.: Robertsonian translocations: mechanisms of formation, aneuploidy, and uniparental disomy and diagnostic considerations. *Genet. Test.*, 2002, 6, 163-168.
250. Boue A., Gallano P. A collaborative study of the segregation of inherited chromosome structural rearrangement in 1356 prenatal diagnosis. *Prenat. Diagn.*, 1984, 4, 45-67.
251. Roux C., Tripogney C., Morel F. et al.: Segregation of chromosomes in sperm of Robertsonian translocation carriers. *Cytogenet. Genome Res.*, 2005, 111, 291-296.
252. Acar H., Yildirim M.S., Cora T. et al.: Evaluation of segregation patterns of 21;21 Robertsonian translocation along with sex chromosomes and interchromosomal effects in sperm nuclei of carrier by FISH technique. *Mol. Reprod. Dev.*, 2002, 63, 232-236.
253. In't Veld P.A., Broekmans F.J., de France H.P. et al.: Intracytoplasmic sperm injection (ICSI) and chromosomally abnormal spermatozoa. *Hum. Genet.*, 1997, 12, 752-754.
254. Anton E., Blanco J., Egozcue J. et al.: Sperm FISH studies in seven male carriers of Robertsonian translocation t(13;14)(q10;q10). *Hum. Reprod.*, 2004, 19, 1345-1351.
255. Kaiser P.: Pericentric inversions. Problems and significance for clinical genetics. *Hum. Genet.*, 1984, 68, 1-47.
256. Ashley T.: G-band position effects on meiotic synapsis and crossing-over. *Genetics*, 1988, 118, 307-317.
257. Gabriel-Robez O., Ratomponirina C., Rimpler Y. et al.: Synapsis and adjustment in an infertile human male heterozygous for a pericentric inversion in chromosome 1. *Hum. Genet.*, 1986, 72, 148-152.
258. Morel F., Laudier B., Guerif F. et al.: Meiotic segregation analysis in spermatozoa of pericentric inversion carriers using fluorescence in-situ hybridization. *Hum. Reprod.*, 2007, 22, 136-141.
259. Caer E., Perrin A., Douet-Guilbert N. et al.: Differing mechanisms of meiotic segregation in spermatozoa from three carriers of a pericentric inversion of chromosome 8. *Fertil. Steril.*, 2008, 89, 1637-1640.
260. Anton E., Vidal F., Egozcue J. et al.: Genetic reproductive risk in inversion carriers. *Fertil. Steril.*, 2006, 85, 661-666.
261. Chantot-Bastarud S., Ravel C., Berthaut I. et al.: Sperm-FISH analysis in a pericentric chromosome 1 inversion, 46,XY,inv(1)(p22q42), associated with infertility. *Mol. Hum. Reprod.*, 2007, 13, 55-59.
262. Amiel A., Sardos-Albertini F., Fejgin M.D. et al.: Interchromosomal effect leading to an increase in aneuploidy in sperm nuclei in a man heterozygous for pericentric inversion (inv9) and C-heterochromatin. *J. Hum. Genet.*, 2001, 46, 245-250.
263. Kruse R., Guttenbach M., Shartmann B. et al.: Genetic counselling in a patient with XXY/XXXY/XY mosaic Klinefelter's syndrome: estimate of sex chromosome aberrations in sperm before intracytoplasmic sperm injection. *Fertil. Steril.*, 1998, 69, 432-485.
264. Lim A.S., Fong Y., Yu S.: Estimates of sperm sex chromosome disomy and diploidy rates in a 47,XXY/46,XY

- mosaic Klinefelter patient. *Hum. Genet.*, 1999, 104, 405-409.
265. Morel F., Roux C., Bresson J.L.: Segregation of sex chromosomes in spermatozoa of 46,XY/47,XXY men by multicolour fluorescence in-situ hybridization. *Mol. Hum. Reprod.*, 2000, 6, 566-570.
266. Morel F., Bernicot I., Herry A. et al.: An increase incidence of autosomal aneuploidies in spermatozoa from a patient with Klinefelter's syndrome. *Mol. Hum. Reprod.*, 2000, 6, 566-570.
267. Chevret E., Rousseaux S., Monteil M. et al.: FISH on 35,142 sperm nuclei from two 47,XYY males. *Hum. Genet.*, 1997, 99, 407-412.
268. Mercier S., Morel F., Roux C. et al.: Analysis of the sex two-colour fluorescence in-situ hybridization. *Mol. Hum. Reprod.*, 1996, 2, 485-488.
269. Shi Q., Martin R.H.: Multicolor fluorescence in situ hybridization analysis of meiotic chromosome segregation in a 47,XYY male and a review of the literature. *Am. J. Med. Genet.*, 2000, 93,40-46.
270. Martin R.H., McInnes B., Rademaker A.: Analysis of aneuploidy for chromosomes 13, 21, X and Y by multicolour fluorescence in situ hybridization (FISH) in a 47,XYY male. *Zygote*, 1999, 7, 131-134.
271. Benet J., Martin R.H.: Sperm chromosome complements in a 47,XYY man. *Hum. Genet.*, 1988, 78, 313-315.
272. Moretti E., Anichini C., Sartini B. et al.: Sperm ultrastructure and meiotic segregation in an infertile 47,XYY man. *Andrologia*, 2007, 39, 229-234.
273. Gonzales-Merino M.S., Hans C., Abramowicz M. et al.: Aneuploidy study in sperm and preimplantation embryos from nonmosaic 47,XYY men. *Fertil. Steril.*, 2007, 88, 600-606.
274. Mennicke K., Diercks P., Schlieker H. et al.: Molecular cytogenetic diagnostics in sperm. *Int. J. Androl.*, 1997, (Suppl. 3) 11-19.
275. Blennox E., Bui T.H., Kristoffersson U.: Swedish survey on extra structurally abnormal chromosomes in 39 105 consecutive prenatal diagnoses: prevalence and characterization by fluorescence in situ hybridization. *Prenatal Diag.*, 1994, 14, 1019-1028.
276. Buckton K.E., Spowart G., Newton M.S. et al.: Forty four probands with additional „marker” chromosome. *Hum. Genet.*, 1985, 69, 353-370.
277. Liehr T., Mrasek K., Weise A. et al.: Small supernumerary marker chromosomes-progress towards a genotype-phenotype correlation. *Cytogenet. Genome Res.*, 2006, 112, 23-24.
278. Oracova E., Musilova P., Kopečna O. et al.: Sperm and embryo analysis in a carrier of supernumerary inv dup(15) marker chromosome. *J. Androl.*, 2009, 30, 233-239.
279. Crolla J.A., Youings S.A., Ennis S. et al.: Supernumerary marker chromosomes in man: parental origin, mosaicism and maternal age revisited. *Eur. J. Hum. Genet.*, 2005, 13, 154-160.
280. Eggermann K., Mau U.A., Bujdosó G. et al.: Supernumerary marker chromosomes derived from chromosome 15: analysis of 32 new cases. *Clin. Genet.*, 2002, 62, 89-93.
281. Manenti E.: Two extra inv dup(del 15) chromosomes and male infertility: second case. *Am. J. Med. Genet.*, 1992, 42, 402-403.
282. Martin-Lucas M.A., Perez-Castillo A., Abrisqueta J.A.: Infertility associated with two accessory bisatellited chromosomes. *Hum. Genet.*, 1986, 73, 133-13.
283. Mc Nerlan S.E., Morrison P.J., Mc Clure N. et al.: A supernumerary chromosome 20, identified by FISH, in a male with azoospermia – cause or coincidence. *Am. J. Med. Genet.*, 2002, 99, 1-3.
284. Tuerlings J.H., de France H.F., Hamers A. et al.: Chromosome studies in 1792 males prior to intracytoplasmic sperm injection: the Dutch experience. *Eur. J. Hum. Genet.*, 1998, 6, 194-200.
285. Jaafar H, Gabriel-Robez O, Vignon F. et al.: Supernumerary chromosomes and spermatogenesis in a human male carrier. *Hum. Genet.*, 1994, 94, 74-76.
286. Gentile M, Susca F, Resta N. et al.: Infertility in carriers of two bisatellited marker chromosomes. *Clin. Genet.*, 1993, 44, 71-75.
287. Cotter P.D., Ko E., Larabell S.K. et al.: Segregation of a supernumerary del (15) marker chromosome in sperm. *Clin. Genet.*, 2000, 58, 488-492.
288. Tres L.L.: XY chromosomal bivalent: nucleolar attraction. *Mol. Reprod. Develop.*, 2005, 72, 1-6.
289. Turner J.M.A.: Meiotic sex chromosome inactivation. *Development*, 2007, 134, 1823-1831.
290. Lifschytz E., Lindsley D.L.: The role of X-chromosome inactivation during spermatogenesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1972, 69, 182-186.
291. Hotta Y., Chandley A.C. Activities of X-linked enzymes in spermatocytes of mice rendered sterile by chromosomal alteration. *Gamate Res.*, 1982, 6, 65-72.
292. Guichaoua M.R., De Lanversin A., Cataldo C. et al.: Three dimensional reconstructions of a 17;21 reciprocal translocation carrier: study of XY-autosome relationship. *Hum. Genet.*, 1991, 87, 709-715.
293. Jaafar H., Gabriel-Robez O., Rumpler Y.: Pattern of ribonucleic acid synthesis in vitro in primary spermatocytes from mouse testis carrying an X-autosome translocation. *Chromosoma (Berl.)*, 1989, 98, 330-334.
294. Jaafar H., Gabriel-Robez O., Rumpler Y.: Chromosomal anomalies and disturbance of transcriptional activity at the pachytene stage of meiosis: relationship to male sterility. *Cytogenet Cell Genet.*, 1993, 64, 273-280.
295. Turner J.M.A., Mahadevaiah S.K., Ellis P.J. et al.: Pachytene asynapsis drives meiotic sex chromosome inactivation and leads to substantial postmeiotic repression in spermatids. *Dev. Cell.*, 2006, 10, 521-529.
296. Mahadevaiah S.K., Bourc'his D., de Rooij D.G. et al.: Extensive meiotic asynapsis in mice antagonises meiotic silencing of unsynapsed chromatin and consequently disrupts meiotic sex chromosome inactivation. *J. Cell Biol.*, 2008, 182, 263-276.
297. Handel M.S.: The XY body: a specialized meiotic chromatin domain. *Exp. Cell Res.*, 2004, 296, 57-63.
298. Turner J.M.A., Aprelikova O., Xu X. et al.: BRCA1, histone H2Ax phosphorylation, and male meiotic sex chromosome inactivation. *Curr. Biol.*, 2004, 14, 2135-2142.
299. Turner J.M.A., Mahadevaiah S.K., Fernandez-Capetillo O. et al.: Silencing of unsynapsed meiotic chromosomes in the mouse. *Nat. Genet.*, 2005, 37, 41-47.
300. Gabriel-Robez O., Rumpler Y.: The meiotic pairing behaviour in human spermatocytes carrier of chromosome anomalies and their repercussions on reproductive fitness.

- I: Inversions and insertions. A European collaborative study. *Ann. Genet.*, 1994, 37, 3-10.
301. Homolka D., Ivanek R., Capkova J. et al.: Chromosomal rearrangements interfering with meiotic X chromosome inactivation. *Genome Res.*, 2007, 17, 1431-1437.
 302. Metzler-Guillemain C., Mignon C., Depetris D. et al.: Bivalent 15 regularly associates with the sex vesicle in normal male meiosis. *Chromosome Res.*, 1999, 7, 369-378.
 303. Guichaoua MR, Quack B, Speed RM. et al.: Infertility in human males with autosomal translocations: meiotic study of a 14;22 Robertsonian translocation. *Hum Genet.*, 1990, 86, 162-166.
 304. Johannisson R, Löhrs U, Wolff HH. et al.: Two different XY-quadrivalent associations and impairment of fertility in men. *Cytogenet. Cell Genet.*, 1987, 45, 220-230.
 305. Liu J.Y., Wang X.R., Zeng X.L. et al.: Molecular cytogenetic characterization of a familial balanced reciprocal translocation t(11;18)(q13.3;q23) associated with pregnancy wastage. *Cytogenet. Genome Res.*, 2003, 103, 8-13.
 306. Sun F., Oliver-Bonet M., Turek P.J. et al.: Meiotic studies in an azoospermic human translocation (Y;1) carrier. *Mol. Hum. Reprod.*, 2005, 11, 361-364.
 307. Biggers J.D., Whitte W.K., Whittingham D.G.: The culture of mouse embryos in vitro. In: Daniel J.C. editor. *Methods in mammalian embryology*. San Francisco: Freeman W.H. and Co., 1971, 86-116.
 308. Shaffer L.G., Tommerup N. (red.): *An International System for Human Cytogenetic Nomenclature ISCN*. 2005, wyd. S.Karger Publishers, Inc., USA.
 309. Celik-Ozenci C., Catalanotti J., Jakab A. et al.: Human sperm maintain their shape following decondensation and denaturation for fluorescent in situ hybridization: shape analysis and objective morphometry. *Biol. Reprod.*, 2003, 69, 1347-1355.
 310. Krüger T.F., Menkveld R., Stander F.S. et al.: Sperm morphologic features as prognostic factor in in vitro fertilization. *Fertil. Steril.*, 1986, 46, 1118-1123.
 311. Wiland E., Żegała M., Kurpisz M.: Interindividual differences and alterations in the topology of chromosomes in human sperm nuclei of fertile donors and carriers of reciprocal translocations. *Chromosome Res.*, 2008, 16, 291-305.
 312. World Health Organization: *WHO Laboratory Manual for the Examination of Human Semen and Sperm-Cervical Mucus Interactions*. 3rd ed. Springer Verlag: Berlin, 1992.
 313. Wyandt H.E., Tonk V.S.: *Atlas of human chromosome heteromorphisms*. Dordrecht/ Boston/London: Kluwer Academic Publishers. 2004.
 314. Rogers B.J.: The sperm penetration assay. *Fertil. Steril.*, 1985, 43, 821-840.
 315. Wiland E., Jarmuż M., Kurpisz M.: Segregation of the marker chromosome der(20) in the sperm of a male with karyotype 46,XY[96]/47,XY+mar[4]. *Med. Sci. Monit.*, 2005, 11, 9-15.
 316. Wiland E., Midro A.T., Panasiuk B. et al.: Fluorescence in situ hybridization (FISH) analysis of meiotic segregation pattern and aneuploidy in spermatozoa of the father and son with reciprocal translocation t(4;5)(p15.1;p12) and prediction of individual probability rate for unbalanced progeny at birth. *J. Androl.*, 2007, 28, 262-272.
 317. Midro A.T., Dębiec-Rychter M., Wiland E. et al.: Clinical, cytogenetic and molecular characterization of monosomy 7q36.2-qter with trisomy 9p21.2-pter in large family of t(7;9)(q36.2;p21.2) carriers. *Mat. zjazd. 5th ECC, Madrid 2005*.
 318. Midro A.T., Wiland E., Panasiuk B. et al.: Risk evaluation of carriers with chromosome reciprocal translocation t(7;13)(q34;q13) and concomitant meiotic segregation analyzed by FISH on ejaculated spermatozoa. *Am. J. Med. Genet.*, 2006, 140A, 245-256.
 319. Panasiuk B., Zollino M., Wiland E. et al.: Genetic counselling of t(4;8)(p16;p23) carriers identified by FISH. wysłano do druku w *Chromosome Res.*, 2010.
 320. Wiland E., Hobel C. J., Hill D. et al.: Successful pregnancy after preimplantation genetic diagnosis for carrier of t(2;7)(11.2;q22) with high rates of unbalanced sperm and embryos: a case report. *Prenat. Diagn.*, 2008, 28, 36-41.
 321. Cifuentes P., Navarro J., Egozcue J. et al.: Segregation analysis on sperm chromosomes in two carriers of a t(9;17) reciprocal translocation: whole chromosome painting study. *Hum. Reprod.*, 1999, 14(s1), 239-246
 322. Stengel-Rutkowski S., Warkotsch A., Schimanek P. et al.: Familial Wolf's syndrome with a hidden 4p deletion by translocation of an 8p segment. Unbalanced inheritance from a maternal translocation (4;8)(p15.3;p22). Case report, review and risk estimates. *Clin. Genet.*, 1984, 6, 500-521.
 323. Tranebjaerg L., Petersen A., Hove K. et al.: Clinical and cytogenetic studies in a large (4;8) translocation family with pre- and postnatal Wolf syndrome. *Ann. Genet.*, 1984, 27, 229-229.
 324. Olszewska M., Wiland E., Kurpisz M.: Positioning of chromosomes 15, 18, X and Y centromeres in sperm cells of fertile individuals and infertile patients with increased level of aneuploidy. *Chromosome Res.*, 2008, 16, 875-890.
 325. Sassone-Corsi P.: Unique chromatin remodeling and transcriptional regulation in spermatogenesis. *Science*, 2002, 296, 2176-2178.
 326. Wiland E., Wojda A., Kamieniczna M. et al.: Idiopathic infertility in married couples in the light of cytogenetic analysis and sperm penetration assay. *Folia Histochem. Cytobiolog.*, 2001, 39, 35-41.
 327. Krüger T.F., Coetzee K.: Predicting treatment success for male infertility. In *Fertility and Reproductive Medicine*, Kempers R.D., Cohen J., Haney A.F. and Younger J.B. (eds), Elsevier Sci. Pub., 1998, 465-474.
 328. Oehninger S., Franken D.R., Sayed E. et al.: Sperm function assays and their predictive value for fertilization outcome in IVF therapy: a meta-analysis. *Hum. Rep. Update*, 2000, 6, 160-168.
 329. Yanagimachi R., Yanagimachi H., Rogers B.J.: The use of zona-free animal ova as a test-system for the assessment of the fertilizing capacity of human spermatozoa. *Biol. Reprod.*, 1976, 15, 471-476.
 330. Aoki V.W., Peterson C.M., Parker-Jones K. et al.: Correlation of sperm penetration assay score with polyspermy rate in in-vitro fertilization. *J. Experiment. Clinical Ass. Reprod.*, 2005, 2, 2-3.
 331. Freeman M.R., Archibong A.E., Mrotek J.J. et al.: Male partner screening before in vitro fertilization: preselecting patients who require intracytoplasmic sperm injection with the sperm penetration assay. *Fertil. Steril.*, 2001, 76, 1113-8.

332. Zainul Rashid M.R., Fishel S.B., Thornton S. et al.: The predictive value of the zona-free hamster egg penetration assay: its prognostic value for sperm-oolemma interaction. *Hum. Reprod.*, 1998, 13, 624-629.
333. Shibahara H., Mitsuo M., Inoue M. et al.: Relationship between human in-vitro fertilization and intracytoplasmic sperm injection and the zona-free hamster egg penetration test. *Hum. Reprod.*, 1998, 13, 1928-1932.
334. Carrell D.T., Udoff L.T., Hatasaka H.H. et al.: Predictability/variability of a modified sperm penetration assay (SPA): review of 1033 patients undergoing zona-free hamster oocyte sperm penetration analyses/IVF. *Adv. Reprod.*, 1998, 1, 45-56.
335. Biljan M.M., Taylor C.T., Manasse P.R. et al.: Evaluation of different sperm function tests as screening methods for male fertilization potential--the value of the sperm migration test. *Fertil Steril.*, 1994, 62, 591-598.
336. Ron-el R., Nachum H., Herman A. et al.: Delayed fertilization and poor embryonic development associated with impaired semen quality. *Fertil Steril.* 1991, 55, 338-44.
337. Grow D.R., Oehninger S., Seltman H.J. et al.: Sperm morphology as diagnosed by strict criteria: probing the impact of teratozoospermia on fertilization rate and pregnancy outcome in a large in vitro fertilization population. *Fertil Steril.*, 1994, 62, 559-67.
338. Ombelet W., Fourie F.L., Vandeput H. et al.: Teratozoospermia and in-vitro fertilization: a randomized prospective study. *Hum. Reprod.*, 1994, 9, 1479-84.
339. Coetzee K., Kruger T.F., Lombard C.J.: Predictive value of normal sperm morphology: a structured literature review. *Hum. Reprod.*, 1998, 4, 73-82.
340. Terriou P., Giorgetti C., Auquier P. et al.: Teratozoospermia influences fertilization rate in vitro but not embryo quality. *Hum Reprod.*, 1997, 12, 1069-72.
341. Keegan BR., Barton S., Sanchez X. et al.: Isolated teratozoospermia does not affect in vitro fertilization outcome and is not an indication for intracytoplasmic sperm injection. *Fertil Steril.*, 2007, 88, 6, 583-1588.
342. Zahalsky M.P., Zoltan E., Medley N. et al.: Morphology and the sperm penetration assay. *Fertil. Steril.*, 2003, 79, 39-41.
343. Wiland E., Wojda A., Kamieniczna M. et al.: Infertility status of male individuals with abnormal spermogram evaluated by cytogenetic analysis and in vitro sperm penetration assay. *Med. Sci. Monit.*, 2002, 8, 394-400.
344. Latos-Bieleńska A., Kołowska J., Jarmuż M. et al.: Mozaicyzm komórkowy z występowaniem dodatkowego chromosomu markerowego u par małżeńskich z niepowodzeniami rozrodu. *Klin.Perinat. Ginekol.*, 1997, 18, 45-52.
345. Rothenmund H., Chundley A.E., Dawson A.J.: Familial transmission of a small supernumerary marker chromosome 8 identified by FISH: an update. *Am. J. Med. Genet.*, 1997, 72, 339-342.
346. Knegh A.C., Li S., Engelen J J et al.: Prenatal diagnosis of a karyotypically normal pregnancy in a mother with a supernumerary neocentric 13q21→13q22 chromosome and balancing reciprocal deletion. *Prenat. Diagn.*, 2003, 23, 215-220.
347. Kumar C., Kleyman S.M., Samonte R.V. et al.: Marker chromosomes in fetal loss. *Hum.Reprod.*, 1997, 12, 1321-1324.
348. Giorlandino C., Calugi G., Iaconianni L. et al.: Spermatozoa with chromosomal abnormalities may result in a higher rate of recurrent abortion. *Fertil.Steril.*, 1998, 70, 576-577.
349. Rubio C., Simon C., Blanco J. et al.: Implications of sperm chromosome abnormalities in recurrent miscarriage. *J. Assist. Reprod. Genet.*, 1999, 16, 253-258.
350. Robinson W.P., McFadden D.E., Stephenson M.D.: The origin of abnormalities in recurrent aneuploidy/polyploidy. *Am. J. Hum. Genet.*, 2001, 69, 1245-1254.
351. Chandley A.C., Maclean N., Edmond P. et al.: Cytogenetics and infertility in man. Testicular histology and meiosis. Results of a five year survey of men attending a subfertility clinic. *Ann. Hum. Genet.*, 1976, 40, 165-176.
352. Hendry W.F., Polani P.E., Pugh R.C. et al.: 200 infertile males: correlation of chromosome, histological, endocrine and clinical studies. *Br. J. Urol.*, 1976, 47, 899-908.
353. Schoysman R., Gerris J.: Twelve-year follow-up study of pregnancy rates in 129 couples with idiopathically impathically impaired male fertility. *Acta Eur. Fertil.*, 1983, 14, 51-56.
354. Engels H., Eggermann T., Caliebe A. et al.: Genetic counseling in Robertsonian translocations der(13;14): Frequencies of reproductive outcomes and infertility in 101 pedigrees. *Am. J. Med. Genet. Part A*, 2008, 146A:2611-2616.
355. Steinberger E., Rodrigues-Rigau L.J.: The infertile couples. *J. Androl.*, 1983, 4, 111-118.
356. Van der Ven K., Pescha B., Montag M. et al.: Increased frequency of congenital chromosomal aberrations in female partners of couples undergoing intracytoplasmic sperm injection. *Hum. Reprod.*, 1998, 13, 48-54.
357. Nielsen J., Wohler M.: Chromosome abnormalities found among 34,910 newborn children: results from a 13-year incidence study in Arhus, Denmark. *Hum. Genet.*, 1991, 85, 49-54.
358. Collodel G., Moretti E., Capitani S. et al.: TEM, FISH and molecular studies in infertile men with pericentric inversion of chromosome 9. *Andrologia*, 2006, 38, 122-127.
359. Cortes-Gutierrez E.L., Cerda-Flores R.M., Davila-Rodriguez M.I. et al.: Chromosomal abnormalities and polymorphisms in Mexican infertile men. *Arch. Androl.*, 2004, 50, 261-265.
360. Srebrniak M., Wawrzekiewicz A., Wiczowski A. et al.: Subfertile couple with inv(2), inv(9) and 16qh+. *J. Appl. Genet.*, 2004, 50, 261-265.
361. Teo S.H., Tan M., Knight L. et al.: Pericentric inversion 9-incidence and clinical significance. *Ann. Acad. Med. Singapore*, 1995, 24, 302-304.
362. Uehara S., Akai Y., Takeyama Y. et al.: Pericentric inversion of chromosome 9 in prenatal diagnosis and infertility. *Tohoku J. Exp. Med.*, 1992, 166, 417-427.
363. Yakin K., Balaban B., Urman B.: Is there a possible correlation between chromosomal variants and spermatogenesis? *Int. J. Urol.*, 2005, 12, 984-989.
364. Codina-Pascual M., Navarro J., Oliver-Bonet M. et al.: Behaviour of human heterochromatic regions during the synapsis of homologous chromosomes. *Hum. Reprod.*, 2006, 21, 1490-1497.
365. Solari A.J., Ponzio R., Rey Valzacchi G.: Synaptonemal complex karyotyping in an oligospermic patients with

- heterochromatin duplication in chromosome n. 9. *Medicina (B Aires)*, 1991, 51, 2170221.
366. Madon P.F., Athalye A.S., Parikh F.R.: Polymorphic variants on chromosomes probably play a significant role in infertility. *Reprod. Biomed. Online*, 2005, 11, 726-731.
 367. Penna V.S., Araujo H., Ballesta F. et al.: Chromosomal abnormalities and polymorphisms in infertile men. *Arch. Androl.*, 2001, 46, 205-210.
 368. Eiben B., Leipoldt M., Rammelsberg O. et al.: High incidence of minor chromosomal variants in teratozoospermic males. *Andrologia*, 1987, 19, 684-687.
 369. Nakamura Y., Kitamura M., Nishimura K. et al.: Chromosomal variants among 1790 infertile men. *Int. J. Urol.*, 2001, 8, 49-52.
 370. Nagvenkar P., Zaveri K., Hinduja I.: Comparison of the sperm aneuploidy rate in severe oligozoospermic and oligozoospermic men and its relation to intracytoplasmic sperm injection outcome. *Fertil. Steril.*, 2005, 84, 925-931.
 371. Tempest H.G., Homa S.T., Dalakiouridou M. et al.: The association between male infertility and sperm disomy: evidence for variation in disomy levels among individuals and a correlation between particular semen parameters and disomy of specific chromosome pairs. *Reprod. Biol. Endocrinol*, 2004, 2, 82-90.
 372. Robbins W.A., Segraves R., Pinkel D. et al.: Detection of aneuploid human sperm by fluorescence in situ hybridization – evidence for a donor difference in frequency of sperm disomic for chromosomes 1 and Y. *Am. J. Hum. Genet.*, 1993, 52, 799-807.
 373. Tempest H.G., Ko E., Rademaker A. et al.: Intra-individual and inter-individual variations in sperm aneuploidy frequencies in normal men. *Fertil. Steril.*, 2009, 91, 185-92.
 374. Blanco J., Gabau E., Gomez D. et al.: Chromosome 21 disomy in the spermatozoa of the fathers of children with trisomy 21 in a population with a high prevalence of Down's syndrome. Increased incidence in cases of paternal origin. *Am. J. Hum. Genet.*, 1998, 63, 1067-1072.
 375. Moosani N., Chernos J., Lowry R.B. et al.: A 47,XXY fetus resulting from ICSI in a man with an elevated frequency of 24,XY spermatozoa. *Hum. Reprod.*, 1999, 14, 1137-1138.
 376. Tomasci-Cheeseman L.M., Lowe X.R., Eskenazi B. et al.: A father of four consecutive trisomic pregnancies with elevated frequencies of associated aneuploid sperm. *Am. J. Med. Genet.*, 2006, 140A, 1840-1845.
 377. Martínez-Pasarell O., Nogues C., Bosch M. et al.: Analysis of sex chromosome aneuploidy in sperm from fathers of Turner syndrome patients. *Hum. Reprod.*, 1999, 104, 345-349.
 378. Guichaoua M.R., Perrin J., Metzler-Guillemain C. et al.: Meiotic anomalies in infertile men with severe spermatogenic defects. *Hum. Reprod.*, 2005, 20, 1897-1902.
 379. Malmanche N., Maia A., Sunkel C.E.: The spindle assembly checkpoint: Preventing chromosome mis-segregation during mitosis and meiosis. *FEBS Lett.*, 2006, 580, 2888-2895.
 380. Vogt E., Kirsch-Volders M., Parry J. et al.: Spindle formation, chromosome segregation and the spindle checkpoint in mammalian oocytes and susceptibility to meiotic error. *Mutation Res.*, 2008, 651, 14-29.
 381. Wang W-H., Sun Q-Y.: Meiotic spindle, spindle checkpoint and embryonic aneuploidy. *Frontiers in Bioscience*, 2006, 11, 620-636.
 382. Wolgemuth D.J., Laurion E., Lele K.M.: Regulation of mitotic and meiotic cell cycles in the male germ line. *Recent Prog. Horm. Res.*, 2002, 57, 75-101.
 383. Gazvani M.R., Wilson E.D., Richmond D.H. et al.: Evaluation of the role of mitotic instability in karyotypically normal men with oligozoospermia. *Fertil. Steril.*, 2000, 73, 51-5.
 384. Gazvani M.R., Wilson E.D., Richmond D.H. et al.: Role of mitotic control in spermatogenesis. *Fertil. Steril.*, 2000, 74, 251-256.
 385. De Palma A., Burrello N., Barone N. et al.: Patients with abnormal sperm parameters have an increased sex chromosome aneuploidy rate in peripheral leukocytes. *Hum. Reprod.*, 2005, 20, 2153-2156.
 386. Rives N., Joly G., Machy A. et al.: Assessment of sex chromosomes aneuploidy in sperm nuclei from 47,XXY and 46,XY/47,XXY males: comparison with fertile and infertile males with normal karyotype. *Mol. Hum. Reprod.*, 2000, 6, 107-112.
 387. Rubes J., Lowe X., Moore D. et al.: Smoking cigarettes is associated with increased sperm disomy in teenage men. *Fertil. Steril.*, 1998, 70, 715-723.
 388. Goldman A.S., Hultén M.A.: Analysis of chiasma frequency and first meiotic segregation in a human male reciprocal translocation heterozygote, t(1;11)(p36.3;q13.1), using fluorescence in situ hybridisation. *Cytogenet. Cell Genet.*, 1993, 63, 16-23.
 389. Laurie D.A., Palmer R.W., Hultén M.A.: Studies on chiasma frequency and distribution in two fertile men carrying reciprocal translocations; one with a t(9;10) karyotype and one with a t(Y;10) karyotype. *Hum. Genet.*, 1984, 68, 235-47.
 390. Lian J., Yin Y., Oliver-Bonet M. et al.: Variation in crossover interference levels on individual chromosomes from human males. *Hum. Mol. Genet.*, 2008, 17, 2583-2594.
 391. Cans C., Cohen O., Mermet M.-A. et al.: Human reciprocal translocations: is the unbalanced mode at birth predictable? *Hum. Genet.*, 1993, 91, 228-232.
 392. Faraut T., Mermet M.A., Demongeot J. et al.: Cooperation of selection and meiotic mechanisms in the production of imbalances in reciprocal translocations. *Cytogenet. Cell Genet.*, 2000, 88, 15-21.
 393. Jalbert P., Sele B., Jalbert H.: Reciprocal translocations: a way to predict the mode of imbalanced segregation by pachytene-diagram drawing. *Hum. Genet.*, 1980, 55, 209-222.
 394. Escudero T., Abdelhadi I., Sandalinas M. et al.: Predictive value of sperm fluorescence in situ hybridization analysis on the outcome of preimplantation genetic diagnosis for translocations. *Fertil. Steril.*, 2003, 79, 1528-1534.
 395. Estop A.M., Cieply K.M., Munne S. et al.: Multicolor fluorescence in situ hybridization analysis of the spermatozoa of a male heterozygous for a reciprocal translocation t(11;22)(q23;q11). *Hum. Genet.*, 1999, 104, 412-417.
 396. Geneix A., Schubert B., Force A. et al.: Sperm analysis by FISH in a case of t(17;22)(q11;q12) balanced translocation: case report. *Hum. Reprod.*, 2002, 17, 325-331.

397. Martini E., VonBergh A.R.M., Coonene E. et al.: Detection of structural abnormalities in spermatozoa of a translocation carrier t(3;11)(q27.3;q24.3) by triple FISH. *Hum. Genet.*, 1998, 102, 157-165.
398. Van Assche E., Staessen C., Vegetti W. et al.: Preimplantation genetic diagnosis and sperm analysis by fluorescence in situ hybridization for the most common reciprocal translocation t(11;22). *Mol. Hum. Reprod.*, 1999, 5, 682-690.
399. Anton E., Vidal F., Egozcue J. et al.: Preferential alternate segregation in the common t(11;22)(q23;q11) reciprocal translocation: sperm FISH analysis in two brothers. *Reprod. Bio. Med. Online*, 2004, 9, 637-644.
400. Cora T., Acar H., Kaynak M.: Molecular cytogenetic detection of meiotic segregation patterns in sperm nuclei of carriers of 46,XY,t(15;17)(q21;q25). *J. Androl.*, 2002, 23, 793-798.
401. Estop A.M., Levinson F., Ciepły K. et al.: The segregation of a translocation (1;4) in a two male carriers heterozygous for the translocation. *Hum. Genet.*, 1992, 89, 425-429.
402. Morel F., Douet-Guilbert N., Roux C. et al.: Meiotic segregation of a t(7;8)(q11.21cen) translocation in two carrier brothers. *Fertil. Steril.*, 2004, 1, 682-685.
403. Rousseaux S., Chevret E., Monteil M. et al.: Meiotic segregation in males heterozygote for reciprocal translocation: analysis of sperm nuclei by two and three colour fluorescence in situ hybridization. *Cytogenet. Cell Genet.*, 1995, 71, 240-246.
404. Martin R.H., Spriggs E., Ko E., Rademaker A.W.: The relationship between paternal age, sex ratios, and aneuploidy frequencies in human sperm, as assessed by multicolor FISH. *Am. Hum. Genet.*, 1995, 57, 1395-1399.
405. Carrell D.T., Wilcox A.L., Udoff L.C. et al.: Chromosome 15 aneuploidy in the sperm and conceptus of a sibling with variable familial expression of round-headed sperm syndrome. *Fertil. Steril.*, 2001, 76, 1258-1260.
406. Ashley T., Gaeth A.P., Inagaki H. et al.: Meiotic recombination and spectral proximity in the etiology of the recurrent t(11;22). *Am. J. Hum. Genet.*, 2006, 79, 524-538.
407. Pellestor F., Girardet A., Coignet L. et al.: Cytogenetic analysis of meiotic segregation in sperm from two males heterozygous for reciprocal translocations using PRINS and hamster techniques. *Cytogenet. Cell Genet.*, 1997, 78, 202-208.
408. Blanco J., Egozcue J., Clusellas J. et al.: FISH on sperm heads allows the analysis of chromosome segregation and interchromosomal effects in carriers of structural rearrangements: results in a translocation carrier, t(5;8)(q33;q13). *Cytogenet. Cell Genet.*, 1998, 83, 275-280.
409. Durak B., Ozon Y.H., Ozdemir M. et al.: FISH analysis with locus-specific probes in sperm from two translocation carrier men. *Clin. Genet.*, 1999, 56, 129-135.
410. Honda H., Miharu N., Ohashi Y. et al.: Analysis of segregation and aneuploidy in two reciprocal translocation carriers, t(3;9)(q26.2;q32) and t(3;9)(p25;q32), by triple-color fluorescence in situ hybridization. *Hum. Genet.*, 1999, 105, 428-436.
411. Trappe D., Bohm D., Kohlhasse J. et al.: A novel family-specific translocation t(2;20)(p24.1;q13.1) associated with recurrent abortions: molecular characterization and segregation analysis in male meiosis. *Cytogenet. Genome Res.*, 2002, 98, 1-8.
412. Van Hummelen P., Manchester D., Lowe X. et al.: Meiotic segregation, recombination, and gamete aneuploidy assessed in a t(1;10)(p22.1;q22.3) reciprocal translocation carrier by three- and four-probe multicolor FISH in sperm. *Am. J. Hum. Genet.*, 1997, 61, 651-659.
413. Cifuentes P., Navarro J., Blanco J. et al.: Cytogenetic analysis of sperm chromosomes and sperm nuclei in a male heterozygous for a reciprocal translocation t(5;7)(q21;q32) by in situ hybridization. *Eur. J. Hum. Genet.*, 1999, 7, 231-239.
414. Mercier S., Morel F., Fellman F. et al.: Molecular analysis of the chromosomal equipment in spermatozoa of a 46,XY,t(7;8)(q11.21;cen) carrier by in situ hybridization. *Hum. Genet.*, 1998, 102, 446-451.
415. Oliver-Bonet M., Navarro J., Codina-Pascual M. et al.: From spermatocytes to sperm: meiotic behaviour of human male reciprocal translocations. *Hum. Reprod.*, 2004, 19, 2515-2522.
416. Stene J., Stengel-Rutkowski S.: Genetic risks for familial reciprocal translocations with special emphasis on those leading to 9p, 10p and 12p trisomies. *Ann. Hum. Genet.*, 1982, 46, 41-74.
417. Midro A.T., Stengel-Rutkowski S., Krajewska-Walasek M. et al.: Different risk in two familial translocations t(9;12) with similar breakpoints. *Ann. Genet.*, 1992, 35, 33-40.
418. Estop A.M., Van Kirk, Ciepły K.: Segregation analysis of four translocations, t(2;8), t(3;15), t(5;7), and t(10;12), by sperm chromosome studies and a review of the literature. *Cytogenet. Cell Genet.*, 1995, 70, 80-87.
419. Munne S.: Analysis of chromosome segregation during preimplantation genetic diagnosis in both male and female translocation heterozygotes. *Cytogenet. Genome Res.*, 2005, 111, 305-309.
420. Mackie Ogilvie C., Scriven P.N.: Meiotic outcomes in reciprocal translocation carriers ascertained in 3-day human embryos. *Eur. J. Hum. Genet.*, 2002, 10, 801-6.
421. Yakut T., Ercelen N., Acar H. et al.: Meiotic segregation analysis of reciprocal translocations both in sperms and blastomeres. *Am. J. Med. Genet. A.*, 2006, 140, 1074-82.
422. Mudrak O., Chandra R., Jones E. et al.: Reorganisation of human sperm nuclear architecture during formation of pronuclei in a model system. *Reprod. Fertil. Develop.*, 2009, 21, 665-671.
423. Sbracia M., Baldi M., Cao D. et al.: Preferential location of sex chromosomes, their aneuploidy in human sperm, and their role in determining sex chromosome aneuploidy in embryos after ICSI. *Hum. Reprod.*, 2002, 17, 320-324.
424. Brinkley B.R.: Arrangements of kinetochores in mouse cells during meiosis and spermiogenesis. *Chromosoma*, 1986, 94, 266-272.
425. Dressler B., Schmid M.: Specific arrangements of chromosomes the spermiogenesis of Gallus domesticus. *Chromosoma*, 1976, 58, 387-391.
426. Tilgen N., Guttenbach M., Schmid M.: Heterochromatin is not an adequate explanation for close proximity of interphase chromosomes 1-9, 9-Y, and 16-Y in human spermatozoa. *Exp. Cell Res.*, 2001, 265, 283-287.
427. Garagna S., Zuccotti M., Thornhill A. et al.: Alteration of nuclear architecture in male germ cells of chromosomally derived subfertile mice. *J. Cell Science*, 2001, 114, 4429-4434.

428. Celik-Ozenci C, Jakab A, Kovacs T. et al.: Sperm selection for ICSI: shape properties do not predict the absence or presence of numerical chromosomal aberrations. *Hum. Reprod.*, 2004, 19, 2052-2059.
429. Iwarsson E, Malmgren H, Inzunza J. et al.: Highly abnormal cleavage divisions in preimplantation embryos from translocation carriers. *Prenat. Diagn.*, 2000, 20, 1038-1047.
430. Pujol A., Benet J., Staessen C. et al.: The importance of aneuploidy screening in reciprocal translocation carriers. *Reproduct.*, 2006, 131, 1025-1035.
431. Finch K.A., Fonseka K.G.L., Abogrein A. et al.: Nuclear organization in human sperm: preliminary evidence for altered sex chromosome centromere position in infertile males. *Human Reprod.*, 2008, 23, 1260-127.
432. Moskovtsev S., White J., Wilis J. et al.: Disrupted telomere-telomere interactions are associated with DNA damage in human spermatozoa. Abstracts: Florence-Utah International Symposium "Genetics of Male Infertility". Florence, 14-16 September 2007.
433. Mudrak O., Zalensky A.: Male infertility: diagnosis and treatment (Oehninger S. and Kruger T.F., eds.), Informa Healthcare, London, 2007, 73-85.

Adres do korespondencji:
dr n. przyrod. Ewa Wiland
Instytut Genetyki Człowieka PAN
60-479 Poznań
ul. Strzeszyńska 32
ewila@man.poznan.pl

REDAKTOR NACZELNY*EDITOR IN CHIEF*

prof. dr hab. Marian Grzymisławski

SEKRETARZ REDAKCJI*EDITORIAL SECRETARY*

mgr Danuta Węglewska

SEKRETARIAT*SECRETARY*

mgr Grażyna Dromirecka

dr med. Włodzimierz Szczepaniak

mgr Danuta Węglewska

KOMITET REDAKCYJNY*EDITORIAL BOARD*

prof. dr hab. Maria Borysewicz-Lewicka (Poznań)

prof. dr hab. Grzegorz H. Bręborowicz (Poznań)

prof. dr hab. Magdalena Czarnecka-Operacz (Poznań)

prof. dr hab. Mieczysława Czerwionka-Szaflarska
(Bydgoszcz)

prof. Wolfgang Dick (Mainz – Niemcy)

prof. dr hab. Leon Drobnik (Poznań)

prof. dr hab. Janusz Gadzinowski (Poznań)

prof. dr hab. Wojciech Golusiński (Poznań)

prof. dr hab. Witold Jurczyk (Poznań)

prof. dr hab. Jacek Juszczyk (Poznań)

prof. dr hab. Halina Karoń (Poznań)

prof. UM dr hab. Ryszard Koczorowski (Poznań)

prof. UM dr hab. Tomasz Kościński (Poznań)

prof. Odded Langer (Nowy Jork – USA)

prof. dr hab. Leszek Lewandowski (Poznań)

prof. dr hab. Krzysztof Linke (Poznań)

prof. Tadeusz Maliński (Athens – USA)

prof. UM dr hab. Roman K. Meissner

prof. UM dr hab. Michał Musielak (Poznań)

prof. dr hab. Leszek Paradowski (Wrocław)

mgr Aniela Piotrowicz (Poznań)

mgr Bogdan Poniedziałek (Poznań)

prof. dr hab. dr h.c. Antoni Pruszewicz (Poznań)

prof. dr hab. Kazimierz Rzymiski (Poznań)

prof. dr hab. Krzysztof Słowiński (Poznań)

prof. dr hab. Bruno Szczygieł (Warszawa)

prof. dr hab. Andrzej Szkaradkiewicz (Poznań)

prof. UM dr hab. med. Jacek Szmeja (Poznań)

prof. dr hab. Roman Szulc (Poznań)

prof. Kai Taeger (Regensburg – Niemcy)

prof. dr hab. Krzysztof Wiktorowicz (Poznań)

prof. dr hab. Witold Woźniak (Poznań)

Korekta: Alicja Strzelecka-Żyromska

Skład i łamanie: Barbara Guździół

Warunki prenumeraty:

Prenumeratę „Nowin Lekarskich” prowadzi gł. specjalista ds. promocji wydawnictw uczelnianych mgr Bogumiła Strzelczak – Uniwersytet Medyczny im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu, ul. Bukowska 70, tel./fax (061) 854-72-02. Abonament na rok 2008 wynosi 180,00 zł (30,00 zł za 1 zeszyt). Przedpłat związanych z abonamentem „Nowin Lekarskich” należy dokonywać na konto: Bank Handlowy w W-wie o/Poznań 1030 1247 4771 8000; z dopiskiem „Nowiny Lekarskie”. Pojedyncze egzemplarze można nabyć w Punkcie Sprzedaży Skryptów – Collegium Anatomicum, ul. Święcickiego 6.

Cennik reklam:

reklama jednobarwna – 500,00 zł;

reklama kolorowa – 1500,00 zł

WYDAWNICTWO NAUKOWE UNIwersytetu Medycznego

IM. KAROLA MARCINKOWSKIEGO W POZNANIU

60-812 Poznań, ul. Bukowska 70

tel./fax (061) 854-71-51

Ark. wyd. 11,0. Ark. druk. 12,8. Papier kreda 115 g/m², 64 x 90.

Druk ukończono w kwietniu 2010 r. Zam. nr 57/2010.

WYDAWCA*PUBLISHER*Uniwersytet Medyczny im. Karola Marcinkowskiego
w Poznaniu© Copyright by Uniwersytet Medyczny
im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu**ADRES (ADDRESS):**Klinika Chorób Wewnętrznych, Metabolicznych
i Dietetyki

ul. Przybyszewskiego 49

60-355 Poznań

tel./fax (061) 869-13-14

e-mail: nowiny.lekarskie@ump.edu.pl

http://www.nowiny-lekarskie.pl

ISSN 0860-7397**ISBN 978-83-7597-072-2**

REGULAMIN

Informacje ogólne

1. „Nowiny Lekarskie” zamieszczają prace oryginalne, poglądowe, kazuistyczne, sprawozdania ze zjazdów i konferencji, recenzje książek oraz opracowania z zakresu historii medycyny.
2. Do pracy należy dołączyć zgodę Kierownika jednostki, z której pochodzi doniesienie oraz imię i nazwisko, adres, numer telefonu (faksu) Autora odpowiedzialnego za korespondencję z Redakcją.
3. W piśmie przewodnim należy zamieścić oświadczenie, że nadesłana praca nie była dotąd nigdzie publikowana, ani też nie została złożona do druku w innym czasopiśmie.
4. Prace podlegają recenzji, przy czym recenzenci nie znają nazwisk autorów, ani też nazwy ośrodka, z którego praca pochodzi.
5. Redakcja zastrzega sobie prawo do dokonywania zmian dotyczących stylistyki, mianownictwa i skrótów – bez uzgodnienia z Autorem.
6. Należy używać międzynarodowych nazw leków (w nawiasie można podać nazwy fabryczne) oraz jednostek w układzie SI (jednocześnie w nawiasie można podać jednostki stare).
7. Prace, których przedmiotem badań jest człowiek, muszą posiadać zgodę Komisji Etyki, co należy zaznaczyć w opisie metodyki.
8. Tekst pracy (wraz z rycinami i tabelami) należy składać na nośniku elektronicznym w programie Microsoft Word 2003 lub starszym wraz z wydrukiem w 3 egzemplarzach. Tekst na nośniku powinien być zapisany w formacie A4, bez adiu-stacji (tj. wytłuszczeń, podkreśleń, wcięć akapitowych, itp.). W przypadku przysłania kilku prac – każda winna być umieszczona na oddzielnej dyskiecie.
9. Do tekstu każdej pracy należy dołączyć, na oddzielnych stronach, tytuł, słowa kluczowe i streszczenia – i to zarówno w języku polskim, jak i angielskim.
10. Tabele należy umieścić na oddzielnych stronach. Każda powinna być oznaczona arabską cyfrą i tytułem w języku polskim i języku angielskim, a w tekście trzeba zaznaczyć miejsce jej umieszczenia.
11. Ryciny należy również umieścić na oddzielnych stronach i opatrzyć tytułem w języku polskim i języku angielskim. Ryciny powinny być oznaczone cyframi arabskimi, a w tekście pracy należy zaznaczyć ich miejsce. W razie konieczności ryciny należy podpisać na odwrotnej stronie. Ryciny winny być załączone na nośnikach elektronicznych, tj. dyskiecie lub CD-ROM w formacie tif w rozdzielczości minimum 300 dpi. Jeśli nie ma takiej możliwości, ważne jest, by przesłany wydruk był bardzo dobrej jakości.
12. Piśmiennictwo powinno być napisane na oddzielnej stronie – wg kolejności cytowania (a nie w porządku alfabetycznym). Należy podać: kolejny numer pozycji; nazwiska autorów i pierwsze litery imion (w przypadku, gdy jest więcej niż trzech autorów, należy podać trzech pierwszych i dodać: „i wsp.”, tytuł pracy.
Następnie:
 - a) tytuł czasopisma z zastosowaniem obowiązujących skrótów (wg Index Medicus), rok, tom, numer strony pierwszej i ostatniej, b) tytuł książki, nazwę i siedzibę wydawnictwa, rok wydania, numer strony pierwszej i ostatniej, c) tytuł rozdziału cytowanej książki, nazwisko/nazwiska i pierwsze litery imion autora/autorów tegoż rozdziału, tytuł książki, nazwisko i imię autora (redaktora) książki, nazwę i siedzibę wydawnictwa, rok wydania, numer pierwszej i ostatniej strony cytowanego rozdziału.Zaleca się, by ilość cytowanych pozycji nie przekraczała 35.

Informacje szczegółowe

I. *Prace oryginalne*

- objętość prac nie może przekraczać 15–17 stron, wliczając w to stronę tytułową, streszczenie, tekst właściwy oraz piśmiennictwo
- tekst doniesienia składa się z następujących części:
 - strona tytułowa, która winna zawierać: tytuł pracy, nazwiska i imiona autorów, nazwę instytucji i nazwisko kierownika, z której praca pochodzi
 - strona druga – streszczenie w języku polskim i języku angielskim zawierające 200–250 słów, które winno mieć charakter strukturalny, a więc zawierać: wstęp, cel pracy, metodykę, wyniki i wnioski
 - strona trzecia – tytuł oraz słowa kluczowe w języku polskim i angielskim
 - strona czwarta i następne – pełny tekst pracy podzielony na następujące części: wstęp, materiał i metody, wyniki, dyskusja, wnioski, piśmiennictwo.

II. *Prace kazuistyczne*

- objętość prac kazuistycznych nie powinna przekraczać 3–4 stron, wliczając w to stronę tytułową, słowa kluczowe, streszczenie oraz piśmiennictwo.

III. *Prace poglądowe*

- objętość prac poglądowych nie powinna przekraczać 15–20 stron.

IV. *Sprawozdania ze zjazdów i recenzje*

- objętość sprawozdań i recenzji nie powinna przekraczać 2 stron.

INSTRUCTIONS TO AUTHORS

General

1. *Nowiny Lekarskie* (Medical News) publish original papers, reviews, case descriptions, reports from meetings and conferences, book reviews and papers on history of medicine.
2. The manuscript should be supplemented by consent of the head of the unit from which the report originates, and by name, surname, address and telephone (fax) number of the author responsible for correspondence with the Editorial Office.
3. The papers should be accompanied by a declaration of the authors that the submitted paper has not been published previously or submitted to other journals.
4. The papers undergo a review and the reviewers do not know the authors or the name of the center from which the paper originates.
5. The Editors reserve for themselves the right to introduce changes in the manuscript related to its style, nomenclature and abbreviations without consultation with the authors.
6. International names of drugs should be used (in brackets company's name may be added) and units should follow the SI system (in brackets old units may be added).
7. Studies conducted on humans should receive first the consent of Ethical Commission, which should be declared in the Methods.
8. The text should be submitted, together with figures and tables, on a floppy disc using the Microsoft Word 2003 or older program, with its printout in 3 copies. On the floppy disc the text should be written in A4 format, without editorial preparation (i.e., without specification of bold type, underlining, indentations, etc.). When several papers are submitted in parallel, each of them should be recorded on a separate floppy disc.
9. Every paper should be supplemented by the title, key words and an abstract in Polish and in English, on separate sheets/pages.
10. Tables should be submitted on separate sheets/pages. Each should be marked by an Arabic numeral and a title in Polish and in English. In the text, the location of the table should be marked.
11. Also figures should be submitted on separate sheets/pages and supplied with a title in Polish and in English. The figures should be numbered with Arabic numerals and their position in the text should be marked. If needed, the figures may be signed on the reverse side. Figures should be submitted in an electronic form, i.e. on a floppy disc or CD-ROM in tif format with a minimum of 300 dpi. If they cannot be submitted in such a form, it is important that the submitted print is of a very high quality.
12. References should be submitted on a separate sheet/page, in the order in which they appear in the text (not in alphabetical order). The reference number should be followed by names and initials of authors (if there are more than three authors, the first three should be followed by "et al.") and title of the paper should be given. Subsequently: a) the journal title should be specified using the Index Medicus abbreviations, year of publication, volume, numbers of the first and the last page or b) title of the book, editor, year of publication should be followed by numbers of the first and the last page or c) title of the chapter of cited book should be given, with surname/surnames and initials of the author(s) of the chapter, title of the book with the surname and name of its author(s)/editor(s), name and site of the editor, year of publication, numbers of the first and the last page of the cited chapter.
Recommended amount of cited references should be limited to 35.

Detailed informations

- I. *Original papers*
 - the size of a paper cannot exceed 15–17 pages, including the title page, summary, the proper text and references
 - the text should include:
 - title page with the title of the paper, surnames and names of authors, name of the institution from which the paper originates and name of the head of the institution
 - the second page with abstracts in Polish and in English, each containing 200–250 words and consisting of introduction, the aim of study, methods, results and conclusions
 - the third page containing the title and key words in Polish and in English
 - the fourth and the following pages containing the full text of the paper divided into introduction, material and methods, results, discussion, conclusions and references.
- II. *Case descriptions*
 - their volume should not exceed 3–4 pages, including the title page, key words, summary and references.
- III. *Reviews*
 - their volume should not exceed 15–20 pages.
- IV. *Reports from meetings and conferences*
 - volume of reports and book reviews should not exceed 2 pages.