

původní práce

TESTIKULÁRNÍ ANEUPLOIDIE SPERMIÍ MUŽŮ S TRANSVERZÁLNÍ LÉZÍ MÍŠNÍ

TESTICULAR SPERM ANEUPLOIDY IN MEN WITH SPINAL CORD INJURY

Jiří Heráček^{1,2,3}, Vladimír Sobotka^{1,2,4},
Miluše Vozdová⁵, Jiří Rubeš⁵,
Michael Urban^{1,2,3}, Robert Grill^{1,2}

¹Univerzita Karlova v Praze, 3. lékařská
fakulta, Urologická klinika

²Fakultní nemocnice Královské Vinohrady,
Urologická klinika

³Androgeos, Praha

⁴Pronatal, Praha

⁵Výzkumný ústav veterinárního lékařství,
v.v.i., Brno

Došlo: 18. 10. 2012.

Přijato: 11. 12. 2012.

Kontaktní adresa

doc. MUDr. Jiří Heráček, Ph.D., MBA
Urologická klinika 3. LF UK
Ruská 87, 100 00 Praha 10
e-mail: jiri.heracek@lf3.cuni.cz

Práce vznikla za podpory grantu IGA MZ
č. NS9967 a výzkumného záměru MZE
0002716202.

Projekt byl schválen Etickou komisí 3. lékařské
fakulty Univerzity Karlovy v Praze.

Střet zájmů: žádný.

Souhrn

Heráček J, Sobotka V, Vozdová M, Rubeš J,
Urban M, Grill R. Testikulární aneuploidie
spermií mužů s transversální lézí míšní

Cíl:

Stanovit pomocí fluorescenční *in situ* hybridizace frekvenci výskytu numerických abnormalit chromozomů X, Y, 13, 15, 16, 18, 21 a 22 u spermií mužů s transversální lézí míšní. Výsledky porovnat s frekvencí výskytu aneuploidií u kontrolní skupiny zdravých dobrovolníků s normospermií.

Metoda:

Do studie jsme od roku 2010 do roku 2011 zařadili jedenáct (věk 21–41 roků, průměr $\pm$ SEM: $36,2 \pm 11,9$) mužů s anejakulací po transversální lézi míšní. Mikrochirurgickou metodou jsme pacientům odebrali testikulární tkáň se spermiemi, které jsme následně vyšetřili pomocí fluorescenční *in situ* hybridizace. Výsledky jsme porovnali s kontrolní skupinou 10 (věk 26–58 roků, průměr $\pm$ SEM: $37,2 \pm 13,1$) zdravých dobrovolníků, u kterých analýza ejakulátu odebraného masturbací prokázala normospermii.

Výsledky:

U mužů s poraněním míchy jsme ze vzorků testikulárních tkání vyšetřili celkem 2613 spermií. V průměru jsme zjistili 2,95 % spermií disomických a 4,90 % spermií diploidních pro sledované chromozomy. Medián byl 3,54, resp. 1,63, což ukazuje na značnou interindividuální variabilitu ve frekvenci diploidních spermií. U každého zdravého dobrovolníka s normospermií jsme vyšetřili nejméně 5000 spermií. Nalezli jsme 0,62 % spermií disomických a 0,29 % diploidních (medián 1,38, resp. 0,26) pro sledo-

vané chromozomy. Frekvence výskytu chromozomálně abnormálních spermií byla u pacientů s poraněním míchy statisticky významně vyšší oproti kontrolní skupině ($p < 0,01$).

Závěr:

Výsledky studie prokázaly vysoký počet spermií s numerickými chromozomálními aberacemi u mužů s transverzální lézí míšní a potvrzují nutnost preimplantační genetické diagnostiky při asistované reprodukci u těchto pacientů.

Klíčová slova:

fluorescenční *in situ* hybridizace, odběr spermií, aneuploidie, transverzální léze míšní.

Summary

Heráček J, Sobotka V, Vozdová M, Rubeš J, Urban M, Grill R. Testicular sperm aneuploidy in men with spinal cord injury

Aim:

The aim of the study was to compare the frequency of numerical abnormalities for chromosomes X, Y, 13, 15, 16, 18, 21 and 22 in men with spinal cord injury to aneuploidy frequency results in normospermic control group of healthy volunteers using fluorescence *in situ* hybridization.

Method:

Eleven men (aged 21–41 years, average $\pm$ SEM: 36.2 ± 11.9) with anejaculation after transversal spinal cord lesions were included into study

between 2010 and 2011. Testicular tissue samples with sperms were obtained by microsurgical retrieval and subsequently analysed by fluorescence *in situ* hybridization. The results were compared with control group of 10 healthy volunteers (aged 26–58 years, average $\pm$ SEM: 37.2 ± 13.1) with proved normospermia from ejaculate obtained by masturbation.

Results:

We examined 2613 sperms obtained from testicular tissue in men with spinal cord injury. We found on average 2.95 % of disomic sperms and 4.90 % of diploid sperms for observed chromosomes. Median was 3.54 and 1.63, resp., which shows a larger inter-individual variability in diploid sperm frequency. We examined at least 5000 sperms in each normospermic volunteer. We found 0.62 % of disomic sperms and 0.29 % of diploid sperms (median 1.38 and 0.26, resp.) for observed chromosomes. The frequency of numerical chromosome aberrations was statistically significantly higher in men with spinal cord injury compared with the control group ($p < 0.01$).

Conclusion:

The study results show high incidence of numerical chromosome aberrations in men with transversal spinal lesion and prove need for genetic work up prior to assisted reproduction.

Key words:

fluorescence *in situ* hybridization, sperm retrieval, aneuploidy, spinal cord injury.

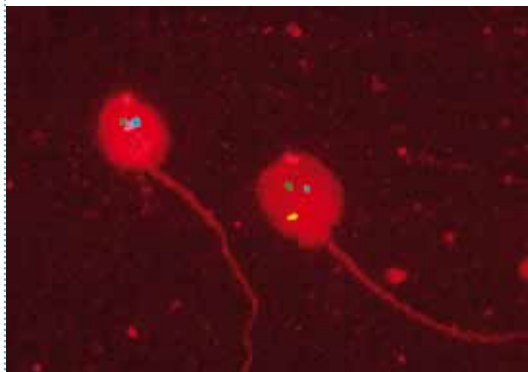
ÚVOD

Každoročně v České republice přibývá okolo 300 pacientů s transverzální lézí míšní (TLM). Více než 60 % těchto úrazů postihuje muže, často ve velmi mladém věku.

Poruchu plodnosti u mužů s TLM způsobují především erektilní a ejakulární dysfunkce, poškozená tvorba, dozrávání a transport spermií ve varlatech a nadvarlatech, infekce močopohlavních cest a hormonální změny. Kvalitu

spermií ovlivňují opakované infekce močopohlavního traktu, technika vyprazdňování močového měchýře, stagnace spermií v semených váčcích při anejakulaci, zvýšená teplota v šourku, hormonální změny v ose hypotalamus–hypofýza–varle, protilátky proti spermiím nebo vedlejší účinky trvalé medikace (1).

Řada výše zmíněných vlivů může zhoršit i genetickou kvalitu spermií – ať již narušením

**Obr. 1.**

Fluorescenční *in situ* hybridizace na spermiích: signály pro chromozomy 21 (zelený), 18 (modrý), X (růžový), 13 (červený) a Y (žlutý)

Fig. 1.

Fluorescence *in situ* hybridization in sperms: signals for chromosomes 21 (green), 18 (blue), X (pink), 13 (red) and Y (yellow)

integrity chromatinu spermií, nebo poruchami spermatogeneze. Výsledkem mohou být numerické aberace chromozomů tzv. aneuploidie, které můžeme diagnostikovat pomocí metody fluorescenční *in situ* hybridizace (FISH), a stanovit tak frekvenci výskytu chromozomálně abnormálních spermií (2).

Cílem práce bylo porovnat frekvence výskytu aneuploidií chromozomů ve spermiích v souboru mužů s TLM a u kontrolní skupiny zdravých dobrovolníků.

METODA

Soubor

Do studie jsme od roku 2010 do roku 2011 zařadili jedenáct mužů s anejakulací po TLM, kterým jsme odebrali spermie mikrocirur- gickou metodou z varlete v rámci léčby ne- plodnosti. Tabulka 1 shrnuje základní charak- teristiku souboru.

Kontrolní skupinu tvořilo 10 zdravých do- brovolníků (věk 26–58 roků, průměr $\pm$ SEM: $37,2 \pm 13,1$), u kterých analýza ejakulátu ode- braného masturbací prokázala normospermii. Ejakulát jsme vyšetřili podle doporučení Svě- tové zdravotnické organizace (3).

Do studie jsme nezařadili pacienty s akutní infekcí, známým endokrinním onemocněním, jaterní poruchou, akutním plicním nebo led- vinovým selháním a anamnézou poranění ze- vního genitálu.

Pacienti podepsali informovaný souhlas schválený Etickou komisí 3. lékařské fakulty Univerzity Karlovy v Praze.

Chirurgický odběr spermií

Pacienti s TLM podstoupili mikrocirur- gický odběr spermií a tkáně varlete v rámci léčby neplodnosti metodou asistované reprodukce. Biologický materiál jsme odebírali metodou M-TESE (microsurgical testicular sperm ex- traction) podle Schlegela (4). Po získání sper- mií pro asistovanou reprodukci jsme odebírali biologický materiál pro studii. Z místa, kde jsme našli spermie, jsme odebrali vzorek tes- tikulární tkáně o velikosti $5 \times 2 \times 1$ mm.

Cytogenetické vyšetření spermií

Tkáň varlete jsme bezprostředně po odbě- ru otiskli na střední část podložního sklíčka na terčík o průměru 10 mm. Sklíčko jsme nechali zaschnout při pokojové teplotě a po přemístění do boxu s odvlhčovačem jsme ho při teplotě do -15 °C skladovali do zpraco- vání metodou FISH. DNA spermií jsme de- kondenzovali a denaturovali inkubací v 1 M NaOH. FISH jsme provedli ve dvou krocích, nejprve se sondou MultiVysion™ PB specifi- kou pro chromozomy 13, 16, 18, 21 a 22 (Vy- sis-Abbott, Abbott Park, IL, USA). Po vyhod- nocení první části FISH následovala druhá část se sondami pro chromozomy X, Y a 15 (Vysis-Abbott). Fluorescenčním mikrosko- pem (BX60, Olympus, Japonsko) vybaveným potřebnými fluorescenčními filtry, fázovým kontrastem a automatickým stolcem pro zá- znam souřadnic jsme vyšetřili všechny mor- fologicky dobře definované nepřekrývající se spermie s bičíkem. Použili jsme hodnotící kritéria podle Rubeše et al. (5). Spermii jsme hodnotili jako disomickou, pokud obsaho-

vala dva fluorescenční signály pro některý s vyšetřovaných chromozomů stejné velikosti oddělené mezerou nejméně o velikosti jednoho signálu (obr. 1). Polohu každé hodnocené spermie jsme zaznamenali v počítači. Spermie jsme znovu vyhledali a vyhodnotili pro zbývající tři chromozomy po druhém kole FISH. Diploidní spermie měly zdvojené signály pro všechny chromozomy.

Statistický rozbor

Demografická a klinická data pacientů jsme zpracovali metodami popisné statistiky. Pro statistickou analýzu jsme použili neparametrický Mannův-Whitneyův test, který jsme vyhodnotili na 5% hladině významnosti s využitím softwaru SPSS, verze 18 pro Windows (SPSS, Chicago, IL, USA). Při zpracování článku jsme se řídili současnými mezinárodními doporučeními pro publikaci výsledků observačních studií (6).

Tab. 1. Základní charakteristika souboru

Table 1. Baseline characteristic of the set

Základní charakteristika souboru	
počet pacientů	11
období	9/2010–6/2011
věk v době vyšetření	36,3 ± 11,9 (21–41) roků
věk v době úrazu	30,1 ± 10,9 (18–32) roků
doba od úrazu při vyšetření	6,2 ± 7,3 (1–9) roků
úroveň přerušení míšního segmentu	10krát krční, 1krát dolní hrudní segment

VÝSLEDKY

Všechny muže jsme vyšetřili nejméně 2 roky po TLM, průměrná doba od TLM do doby našeho vyšetření byla 6,2 ± 7,3 roku. Průměrný věk pacientů v době TLM byl 30,1 ± 10,9 roku, průměrný věk pacientů v době našeho vyšetření byl 36,3 ± 11,9 roku.

U mužů s TLM jsme ze vzorků testikulárních tkání vyšetřili celkem 2613 spermií. Z tohoto

Tab. 2. Frekvence aneuploidií u mužů s transversální lézí míšní a u kontrol

Table 2. Aneuploidy frequency in men with transversal spinal lesion and in controls

	Disomie autozomů	Disomie sexchromozomů	Disomie celkem	Diploidní spermie	Abnormální spermie
muži s TLM	2,45	1,22	3,67	1,63	5,31
	2,94	0,00	2,94	26,47	29,41
	1,97	1,57	3,54	0,39	4,33
	0,43	0,43	0,85	1,71	2,56
	3,27	1,09	4,36	2,18	7,64
	0,67	1,33	2,00	0,00	2,00
	1,47	0,00	1,47	1,47	2,94
	2,57	1,47	4,04	1,10	5,51
	1,39	0,00	1,39	0,46	1,85
	4,48	0,00	4,48	16,42	23,88
	2,49	1,24	3,73	2,07	6,22
medián	2,45	1,09	3,54	1,63	5,31
1. kvartil	1,39	0,00	1,47	0,46	2,56
3. kvartil	2,94	1,33	4,04	2,18	4,64
kontroly	0,36	0,18	0,53	0,44	0,98
	0,31	0,14	0,45	0,21	0,66
	0,35	0,21	0,55	0,23	0,78
	0,61	0,17	0,78	0,39	1,18
	0,28	0,27	0,55	0,26	0,81
	0,47	0,26	0,74	0,27	1,01
	0,33	0,07	0,40	0,23	0,63
	0,17	0,13	0,30	0,26	0,55
	0,44	1,08	1,52	0,18	1,70
	0,29	0,10	0,39	0,41	0,80
medián	0,34	0,17	0,54	0,26	0,80
1. kvartil	0,29	0,12	0,40	0,22	0,65
3. kvartil	0,45	0,27	0,75	0,40	1,05

TLM – transversální léze míšní

TLM – transversal spinal lesion

počtu byla 2,95 % spermií disomických (medián 3,54) a 4,90 % spermií diploidních (medián 1,63) pro sledované chromozomy. U zdravých dobrovolníků jsme zjistili 0,62 % spermií disomických (medián 0,54) a 0,29 % diploidních (medián 0,26) pro sledované chromozomy (tab. 2). Frekvence výskytu chromozomálně abnormálních spermií byla u pacientů s TLM statisticky signifikantně vyšší oproti kontrolní skupině ($p < 0,01$). Zaznamenali jsme značnou interindividuální variabilitu ve frekvenci spermií s chromozomálními poruchami v rozsahu 1,85–29,41 %. Na této variabilitě se významně podílí frekvence diploidních spermií (tab. 2).

DISKUSE

Po zavedení intracytoplazmatické injekce spermie (ICSI) a M-TESE do klinické praxe vyvstala otázka genetické kvality spermií používaných pro asistovanou reprodukci. Vyšší frekvence výskytu numerických aberací často nacházíme v ejakulátu mužů s abnormálním spermiogramem, u nositelů vrozených chromozomálních poruch a ve spermiích získaných metodou M-TESE (7, 8). Zvýšené frekvence výskytu cytogeneticky abnormálních spermií byly zjištěny také u mužů s neobstrukční azoospermii (9–11). Příčinou je pravděpodobně komplexní narušení meiotických a spermatogenetických procesů. Meiotické poruchy jako defekty párování homologních chromozomů a redukce rekombinace mohou být příčinou vzniku aneuploidních gamet a při rozeznání kontrolními mechanismy buněčného cyklu mohou zastavit maturaci a vést k oligo- až azoospermii (10). U neplodných párů s abnormálními výsledky vyšetření spermií metodou FISH byl zjištěn snížený počet otěhotnění a úspěšných implantací embrya a zvýšený počet potratů při asistované reprodukci (11, 12). Zvýšené frekvence aneuploidii byly dokonce zjištěny i v testikulárních spermiích získaných od mužů po vazektomii (11). Tyto nálezy upozorňují na zvýšené riziko vzniku aneuploidních embryí při využití testikulárních spermií pro ICSI.

V současné době známe základní hladiny disomií pro jednotlivé chromozomy, které se při striktních kritériích hodnocení pohybují v rozmezí 0,03–0,47 % (2, 5). V tomto intervalu se pohybuje také frekvence výskytu aneuploidii pro jednotlivé chromozomy u naší kontrolní skupiny. Naši pacienti po TLM mají statisticky významně vyšší frekvenci výskytu aneuploidii, a to 5,8krát

pro autozomy a 2,9krát pro sex chromozomy. Zvláště závažný je podstatně vyšší počet diploidních spermií (17krát), což nasvědčuje závažnému narušení spermiogeneze, zejména u dvou mužů z vyšetřované skupiny. Specifická situace mužů s TLM přispívá k vyšší frekvenci výskytu aneuploidii ve spermiích, vyšší než u obdobné skupiny pacientů bez TLM, kteří podstoupili M-TESE a které Vozdová et al. vyšetřovali stejnou metodikou (8). V této studii měli muži frekvenci disomií chromozomů 6krát vyšší oproti kontrolní skupině, zatímco u námi prezentované skupiny je zvýšení 8,7krát. V odborném tisku nalezneme velmi málo údajů, se kterými můžeme porovnat výsledky naší práce. Qiu et al. vyšetřili spermie odebrané penilní vibrační stimulací od 18 mužů s TLM a zjistili 2,4krát vyšší frekvenci aneuploidii pro vyšetřované autozomy (13, 18 a 21) oproti kontrolní skupině 16 pacientů s psychogenní anejakulací bez TLM (13). Výsledky naší studie, které prokázaly podstatně vyšší frekvenci výskytu aneuploidii u spermií, mohla ovlivnit skutečnost, že jsme sledovali větší počet autozomů. Naopak se shodujeme ve vyšší frekvenci u sex chromozomů, kterou Qiu et al. našli 2,2krát vyšší u mužů s TLM oproti kontrolní skupině pacientů. Autoři této studie bohužel nesledovali diploidní spermie.

Výsledky cytogenetického vyšetření spermií mohou sloužit jako prognostický ukazatel výsledku IVF-ICSI (14), což je patrné na interindividuální variabilitě ve frekvenci aneuploidii ve spermiích i z výsledků naší skupiny pacientů s TLM.

ZÁVĚRY

Výsledky naší studie potvrzují důležitost genetického vyšetření spermií u mužů s TLM před asistovanou reprodukci.

Mechanismy, které ovlivňují vlastnosti spermií mužů s TLM, jsou stále nejasné, proto bude nutné realizovat další studie, které vyhodnotí vliv nervového systému na tvorbu, pohyb a vývoj spermií i na složení biochemických látek v semenné tekutině. Výzkum je třeba zaměřit na změny spermatogeneze a vlastnosti spermií při akutním poranění míchy, v průběhu spinálního šoku a v chronické fázi poranění míchy.

Vysoký výskyt sexuálních dysfunkcí u mužů s TLM poukazuje na potřebu aktivního mezipřístupu k této problematice, nejlépe ve specializovaných centrech.

LITERATURA

1. **Brackett NL, Lynne CM, Ibrahim E, Ohl DA, Sønksen J.** Treatment of infertility in men with spinal cord injury. *Nat Rev Urol* 2010; 7(3): 162–172.
2. **Templado C, Vidal F, Estop A.** Aneuploidy in human spermatozoa. *Cytogenet Genome Res* 2011; 133(2–4): 91–99.
3. **World Health Organisation.** WHO Laboratory Manual for the Examination and Processing of Human Semen, 5th ed. Geneva: World Health Organization 2010.
4. **Schlegel PN.** Testicular sperm extraction: microdissection improves sperm yield with minimal tissue excision. *Hum Reprod* 1999; 14(1): 131–135.
5. **Rubes J, Vozdova M, Oracova E, Perreault SD.** Individual variation in the frequency of sperm aneuploidy in humans. *Cytogenet Genome Res* 2005; 111(3–4): 229–236.
6. **von Elm E, Altman DG, Egger M, Pocock SJ, Gøtzsche PC, Vandenbroucke JP.** The Strengthening the Reporting of Observational Studies in Epidemiology (STROBE) statement: guidelines for reporting observational studies. *J Clin Epidemiol* 2008; 61(4): 344–349.
7. **Calogero AE, Burrello N, De Palma A, Barone N, D'Agata R, Vicari E.** Sperm aneuploidy in infertile men. *Reprod Biomed Online* 2003; 6(3): 310–317.
8. **Vozdova M, Heracek J, Sobotka V, Rubes J.** Testicular sperm aneuploidy in non-obstructive azoospermic patients. *Hum Reprod* 2012; 27(7): 2233–2239.
9. **Gianaroli L, Magli MC, Cavallini G, Crippa A, Nadalini M, Bernardini L, et al.** Frequency of aneuploidy in sperm from patients with extremely severe male factor infertility. *Hum Reprod* 2005; 20(8): 2140–2152.
10. **Ferguson KA, Wong EC, Chow V, Nigro M, Ma S.** Abnormal meiotic recombination in infertile men and its association with sperm aneuploidy. *Hum Mol Genet* 2007; 16(23): 2870–2879.
11. **Rodrigo L, Rubio C, Peinado V, Villamón R, Al-Asmar N, Remohí J, et al.** Testicular sperm from patients with obstructive and nonobstructive azoospermia: aneuploidy risk and reproductive prognosis using testicular sperm from fertile donors as control samples. *Fertil Steril* 2011; 95(3): 1005–1012.
12. **Burrello N, Vicari E, Shin P, Agarwal A, De Palma A, Grazioso C, et al.** Lower sperm aneuploidy frequency is associated with high pregnancy rates in ICSI programmes. *Hum Reprod* 2003; 18(7): 1371–1376.
13. **Qiu Y, Wang LG, Zhang LH, Li J, Zhang AD, Zhang MH.** Sperm chromosomal aneuploidy and DNA integrity of infertile men with anejaculation. *J Assist Reprod Genet* 2012; 29(2): 185–194.
14. **Nicopoulos J, Gilling-Smith C, Almeida PA, Homa S, Nice L, Tempest H, et al.** The role of sperm aneuploidy as a predictor of the success of intracytoplasmic sperm injection? *Hum Reprod* 2008; 23(2): 240–250.