

Analiza mutacji genu *CFTR* u pacjentów z azoospermią, oligozoospermią i astenozoospermią

The analysis of *CFTR* mutations in men with azoospermia, oligozoospermia and asthenozoospermia

Ślęzak Ryszard¹, Szczepaniak Małgorzata², Pasińska Magdalena³,
Czemarmazowicz Halina¹

¹ Katedra i Zakład Genetyki Akademii Medycznej we Wrocławiu

² Katedra i Zakład Patofizjologii Akademii Medycznej we Wrocławiu

³ Katedra Genetyki Klinicznej Collegium Medium UMK w Bydgoszczy

Streszczenie

Mutacje genu *CFTR* odgrywają istotną rolę w etiologii niepłodności męskiej, towarzyszącej mukowiscydozie oraz wywołanej brakiem rozwoju nasieniowodów (CUAVD, CBAVD) azoospermii obstrukcyjnej. Zagadką pozostaje udział mutacji genu *CFTR* w procesie regulacji spermatogenezy i wpływie na powstanie azoospermii nieobstrukcyjnej.

Cel pracy: Celem pracy było określenie częstości występowania mutacji *CFTR* u pacjentów z różnymi typami zaburzeń spermatogenezy.

Materiał: Badania molekularne przeprowadzono w grupie 93 niepłodnych mężczyzn z azoospermią, oligozoospermią i astenoteratozoospermią.

Wyniki: W grupie badanej mutację F508del i wariant polimorficzny IVS8-5T w genie *CFTR* stwierdzono u 5,4% pacjentów. Nie stwierdzono różnic w częstości występowania mutacji *CFTR* w grupach pacjentów z nieobstrukcyjną azoospermią, oligozoospermią i astenoteratozoospermią.

Wnioski: Częstość stwierdzonych mutacji genu *CFTR* w nie różni się w badanych przez nas grupach pacjentów z nieobstrukcyjną azoospermią, oligozoospermią i astenozoospermią i jest podobna do tej obserwowanej w populacji ogólnej.

Słowa kluczowe: **azoospermia / oligospermia / białko *CFTR* / niepłodność męska / aberracje chromosomowe / mutacja / geny /**

Adres do korespondencji:

Ryszard Ślęzak
Katedra i Zakład Genetyki Akademii Medycznej we Wrocławiu
ul. Marcinkowskiego 1, 50-368 Wrocław
e-mail: slezak@gen.am.wroc.pl

Otrzymano: 26.08.2006

Zaakceptowano do druku: 29.05.2007

Abstract

Mutations in cystic fibrosis transductance regulator gene (*CFTR*) are known to result in some forms of male infertility. An association between *CFTR* gene mutations and obstructive azoospermia in cystic fibrosis (CF) and in congenital unilateral and bilateral absence of vas deferens (CUAVD, CBAVD) has been proven. However, the role of *CFTR* gene mutations in the etiology of non-obstructive azoospermia, as well as in the regulation of spermatogenesis remains unsolved.

Objectives: The aim of the study was to evaluate the frequency of *CFTR* mutations in patients diagnosed with different forms of spermatogenesis impairment

Material: The molecular analyses were performed in the group of 93 infertile men, diagnosed with either azoospermia, oligospermia or asthenoteratozoospermia.

Results: The results of the study revealed the presence of F508del and IVS8-T in 5,4% of analyzed cases.

No difference in *CFTR* gene mutations frequencies among patients with azoospermia, oligospermia and asthenoteratozoospermia has been observed.

Conclusion: The *CFTR* gene mutations frequency in men with nonobstructive azoospermia, oligozoospermia and asthenozoospermia is similar to those observed in general population.

Key words: **azoospermia / oligospermia / *CFTR* / infertility male / chromosome – aberrations / mutation /**

Wstęp

Niepłodność małżeńska może dotyczyć nawet do 20% par w polskiej populacji [1]. Czynniki męski odpowiada za ok. 40-60% przyczyn zaburzeń prokreacyjnych. Wśród licznych znanych genetycznych czynników etiologicznych wyróżniamy trzy podstawowe grupy przyczyn.

Do pierwszej należą przedjądrowe zaburzenia, dotyczące nieprawidłowej funkcji podwzgórza i przysadki (zespół Kallmanna, zespół Pradera-Williego, zespół Bardet-Biedl). Funkcja ta może zostać zaburzona także w wyniku odkładania żelaza w przysadce (*beta-talasemia*) czy wywołana mikrowylewami – jak to ma miejsce w anemii sierpowato-krwinkowej.

Drugą ważną grupą przyczyn są zmiany dotyczące samej gonady. Do tej grupy należą aberracje chromosomowe (zespół Klinefeltera, mężczyźni z kariotypem XX, mikrodelecje chromosomu Y), ale także zespół Noonan i niektóre dystrofie mięśniowe, będące przyczyną powstania zmian atroficznych w jądrach.

Trzecią grupę stanowią zaburzenia dotyczące dróg wyprowadzających nasienie (przyczyny pozajądrowe). Zalicza się tu zespoły chorobowe wywołane mutacjami genu *CFTR* (mukowiscydoza, wrodzony jedno- lub obustronny brak nasieniowodów, brak najądrzy), zespół Younga oraz zespoły wywołane zamknięciem dróg wyprowadzających nasienie w wyniku ucisku mechanicznego (zespół policystycznych nerek) czy nieprawidłową funkcją aparatu rzęskowego (zespół Kartagenera).

Do tej grupy zalicza się także zespoły zaburzeń różnicowania płci, w których doszło do nieprawidłowego rozwoju zewnętrznych narządów płciowych mimo prawidłowej budowy i funkcji jądra (zespół niewrażliwości na androgeny, niedobór 5-alfa-reduktazy).

Mukowiscydoza (CF – *cystic fibrosis*) jest chorobą dziedziczną autosomalnie recesywnie. Występuje w rasie kaukaskiej z częstością 1 na 2500 żywo urodzonych noworodków.

Mutacje genu *CFTR* mogą być przyczyną braku lub nieprawidłowej funkcji białka *CFTR*. Prowadzi to do zaburzenia wydzielania jonów chlorkowych przez komórki nabłonka, a w konsekwencji do utrudnienia ewakuacji śluzu z oskrzelików, ząszczczenia wydzieliny i zaciopowania przewodów

wyprowadzających trzustki, agenezji nasieniowodów i zaburzenia funkcji gruczołów potowych. U 85% chorych stwierdza się niewydolność trzustki, a niedrożność smółkowa noworodków stwierdzana jest u 10-20% noworodków z CF. Inne nieklasyczne postacie CF wiążą się z obrazem klinicznym przewlekłego zapalenia zatok, polipami nosa, zespołami wątrobowymi i zapaleniami trzustki [2]. Mutacje genu *CFTR* odpowiadają także za powstanie wrodzonego obustronnego lub jednostronnego braku nasieniowodów (CBAVD – *congenital bilateral absence of vas deferens*, CUAVD – *congenital unilateral absence of vas deferens*). Schorzenie to jest przyczyną niepowodzeń rozrodu u około 6% mężczyzn, u których stwierdza się azoospermie obstrukcyjną i około 1-2% wszystkich przypadków niepłodności męskiej [3].

Gen *CFTR* (*cystic fibrosis transmembrane conductance regulator*) został zlokalizowany na ramieniu długim chromosomu 7 w *locus q31.2* i koduje białko, zaliczane do rodziny białek transportujących ABC, które odpowiedzialne są za transport różnych cząsteczek przez błony wewnątrzkomórkowe. Białko *CFTR*, zbudowane z 1480 aminokwasów o masie ok. 170kDa, funkcjonuje jako kanał kontrolujący transport elektrolitów, w szczególności jonów chlorkowych, przez błony komórek nabłonkowych gruczołów śluzowych dróg oddechowych, trzustki i jelita.

Białko *CFTR* składa się z pięciu domen: dwóch hydrofobowych domen śródbłonowych, jednej domeny regulatorowej i dwóch domen, przyłączających nukleotydy. Kanał chlorkowy jest odpowiedzialny za aktywny transport jonów Cl⁻ przez komórki nabłonka połączony z kotransportem jonów sodowych i potasowych, a być może także jonów wodorowęglanowych i glutationu. Aktywacja kanału chlorkowego ma miejsce w sytuacji nagromadzenia ujemnego potencjału wewnątrz komórki, który zostaje zneutralizowany poprzez przesunięcie jonów chlorkowych na zewnątrz a jonów sodowych i potasowych do wewnątrz komórki. Brak ruchu jonów chlorkowych na zewnątrz komórki przy zachowanej absorpcji jonów sodowych i wtórnie wody do wnętrza komórki, powoduje zwiększenie gęstości śluzu, osłabienia ruchu rzęsek i blokadę oskrzelików, przewodów trzustkowych i dróg wyprowadzających nasienie [4].

Mutacje genu *CFTR* można podzielić na sześć klas.

Klasa I charakteryzuje się nieprawidłową budową produktu białkowego genu i brakiem kanału chlorkowego (należy tu np. mutacja G542X, R553X).

Klasa II nieprawidłową funkcją białka i jego degradacją już w cytoplazmie (przykładem może być F508del czy N1303K).

W klasie III nieprawidłowa jest regulacja kanału chlorkowego i brak odpowiedzi na stymulację cAMP (np. mutacja G551D).

W klasie IV nieprawidłowe jest przewodzenie jonów przez kanał chlorkowy (np. R117H, R347P, R334W, D1152H, R1006C).

W klasie V dominują mutacje powodujące zmniejszenie produkcji mRNA lub liczby prawidłowych białek *CFTR* (np. mutacje 3849+10kbC>T, 621+1G>T).

W klasie VI mutacje genu *CFTR* prowadzą do zaburzenia współdziałania z innymi kanałami jonowymi.

Powstanie azoospermii, wywołanej mutacjami genu *CFTR* może być zależne od dwóch mechanizmów.

W pierwszym mutacje genu *CFTR* zmieniają funkcję regulowanego przez cAMP kanału chlorkowego w domenie śródbłonowej *CFTR* (która odpowiedzialna jest za budowę kanału) lub wpływają na fosforylację obszaru regulacyjnego (otwieranie kanału). W ten sposób nieprawidłowa funkcja kanału chlorkowego może prowadzić, poprzez zagęszczenie wydzieliny w drogach wyprowadzających, do upośledzenia transportu plemników w drogach wyprowadzających nasienie.

Aż 60-70% pacjentów z CBAVD posiada mutacje w genie *CFTR* bez innych objawów mukowiscydozy. W grupie mężczyzn chorych na mukowiscydozę 95% ma objawy obstrukcyjnej azoospermii [5].

Drugim mechanizmem mogącym prowadzić do zaburzeń spermatogenezy może być bezpośredni wpływ białka *CFTR* na proces powstawania i dojrzewania plemników, powodujący w efekcie zmniejszenie liczby dojrzałych plemników w nasieniu i zwiększenie liczby nieprawidłowości budowy na różnych stadiach dojrzewania plemników [5].

Ekspresja białka *CFTR* w tkankach jądrowych a szczególnie w okrągłych spermatocytach oraz niski poziom ekspresji w komórkach Sertoliego mogą wskazywać na udział genu *CFTR* w spermatogenezie [6].

Dotychczasowe wyniki wskazują, że częstość mutacji genu *CFTR* w grupie mężczyzn z nieobstrukcyjną azoospermią, oligozoospermią i astenoospermią wynosi około 2% i jest zbliżona do częstości populacyjnej [7].

Materiał i metody

Pacjenci

Badania przeprowadzono na grupie 93 mężczyzn, skierowanych do poradni genetycznej z powodu niepłodności. Pacjentów podzielono na dwie grupy. Do pierwszej włączono wszystkie przypadki azoospermii, do drugiej przypadki zaburzeń procesu spermatogenezy, prowadzące do zmiany liczby, żywotności lub budowy plemników.

- Grupa 1: azoospermia (35 osób).
- Grupa 2a: ciężka oligozoospermia (16 pacjentów).
- Grupa 2b: oligozoospermia (21 pacjentów)
- Grupa 2c: astenoteratoospermia (21 pacjentów).

U wszystkich pacjentów przeprowadzono wywiad rodzinny, badanie fizykalne i badanie nasienia. Badanie nasienia wykonane było przynajmniej dwukrotnie i w odstępie minimum miesiąca. Oceniano takie parametry jak objętość, pH, ilość plemników w 1ml, ruchliwość, żywotność i budowę plemników.

Azoospermię rozpoznawano w przypadkach, w których nie stwierdzono obecności plemników w nasieniu. W grupie tej stwierdzono 31 przypadków azoospermii nieobstrukcyjnej i 4 przypadki azoospermii obstrukcyjnej (na podstawie takich parametrów jak objętość ejakulatu <2ml, pH poniżej 7,4, brak plemników w nasieniu oraz prawidłowe stężenie FSH w surowicy). Oligospermię rozpoznawano przy liczbie plemników poniżej 20 mln w 1ml ejakulatu, a ciężką postać oligozoospermii przy obecności mniej niż 5 mln plemników w 1ml.

Do grupy astenoospermii kwalifikowano mężczyzn, u których >50% plemników było pozbawione ruchliwości, a do grupy teratoospermii przypadki, w których stwierdzano poniżej 30% prawidłowych morfologicznie form plemników.

Analiza cytogenetyczna

Analizę kariotypu przeprowadzono u wszystkich badanych mężczyzn. Do badań cytogenetycznych wykorzystano limfocyty krwi obwodowej, które poddano 72-godzinnej hodowli w standardowych warunkach. Chromosomy wybarwiono przy użyciu technik GTG i CBG. Do grupy badanej włączono pacjentów bez istotnych klinicznie zmian w kariotypie, które mogłyby być przyczyną niepowodzeń rozrodu.

Analiza molekularna

Genomowy DNA wyizolowano z leukocytów krwi obwodowej metodą fenolowo-solną lub przy użyciu metody GTC (z izotiocyanianem guanidyny) wg procedur zalecanych przez producenta zestawu. U wszystkich badanych pacjentów wykonano podstawowy test zawierający zestaw 8, 12 lub 19 najczęstszych mutacji genu *CFTR* oraz u części pacjentów test rozszerzony zawierający 17 lub 31 mutacji *CFTR*. Przy oznaczeniach stosowano testy firmy Inno-Lipa (*CFTR* -8, -12, -17, -19) oraz zestaw CF v3.0 firmy Abbott Diagnostics przy użyciu technologii PCR i OLA. (Tabela I).

U 20 pacjentów z rozpoznaną azoospermią, u 8 z oligozoospermią i u 3 z astenoospermią oznaczono polimorfizm IVS8-T. Badanie wykonano metodą PCR-OLA lub testem paskowym Inno-LiPa17. Test PCR-OLA wykonano u 30 wybranych pacjentów. U wszystkich pacjentów ze stwierdzoną w podstawowym teście mutacją wykonano rozszerzone badanie przy użyciu zestawów testowych dla 17 i 31 mutacji.

W pierwszym etapie metody paskowej wykonano reakcję multiplex-PCR przy użyciu firmowego zestawu odczynników zawierającego biotynylowane startery, bufor, dNTP. Do mieszaniny dodano badane DNA oraz termostabilną polimerazę Red-Taq (Sigma). Reakcję amplifikacji wykonano na aparacie firmy Perkin-Elmer w następującym programie: denaturacja wstępna w 95°C przez 5 minut, a następnie 30 cykli: denaturacja w 95°C przez 1 minutę, przyłączanie w 57°C przez 1 minutę oraz wydłużanie w 68°C przez 1 minutę. Kontrolę obecności produktów wykonywano przy użyciu elektroforezy na 2% żelu agarozowym.

Tabela I. Zestawienia mutacji genu *CFTR* wykrywanych przy pomocy wykorzystanych w pracy zestawów.

Test Inno-Lipa 8	Test Inno-Lipa 12	Test Inno-Lipa 19	Test Inno-Lipa 17	CF v 3.0
F508del	F508del	F508del	621+1G>T	F508del
G542X	G542X	G542X	3849+10kbC>T	G542X
N1303K	N1303K	N1303K	2183AA>G	N1303K
1717-1	1717-1	1717-1	394delTT	1717-1
W1282X	W1282X	W1282X	2789+5G>A	W1282X
G551D	G551D	G551D	R1162X	G551D
R553X	R553X	R553X	3659delC R117H	R553X
I507	I507	I507	R334W	I507
	S1251N	S1251N	R347P	S549R
	R506T	R560T	G85E	R560T
	3905insT	3905insT	1078delT	3905insT
	Q552X	Q552X	A455E	1898+1(G>A)
		3199del6	2143delT	711+1(G>T)
		I148T	E60X	Q493X
		1898+1(G>A)	2184delA	V520F
		3272-6	711+5G>A	S549N
		711+1(G>T)		3849+10kbC>T
		3120+1(G>A)		3849+4kbA>G
		<i>CFTR</i> dele2,3		R1162X
				G85E
				621+1G>T
				R117H
				Y122X
				1078delT
				R347P
				R347H
				R334W
				A455E
				2183AA>G
				2789+5G>A

Uzyskane w reakcji multiplex-PCR produkty amplifikacji DNA (10ul) poddawano w następnym etapie odwrotnej hybrydyzacji. Po chemicznej denaturacji przeprowadzono reakcję hybrydyzacji z oligonukleotydowymi próbkami umieszczonymi na pasku testowym, a następnie umieszczano próbkę w roztworze zawierającym streptawidynę znakowaną fosforanem alkalicznym.

Reakcje prowadzono zgodnie z danymi producenta zestawu uzyskując zmianę koloru (czarny pasek na pasku testowym) w przypadku obecności mutacji w badanym DNA.

Dla zwiększenia ilości badanych mutacji zastosowano test Cystis Fibrosis PCR/OLA Assay, firmy Applied Biosystems, który daje możliwość określenia 31 mutacji w genie *CFTR*.

Metoda oparta jest na multiplex-PCR genomowego DNA z użyciem AmpliTaq Gold DNA Polimerazy oraz 15 par starterów. Flankują one te regiony genu, gdzie znajdują się miejsca poszczególnych mutacji. Amplifikowane regiony poddawane są hybrydyzacji przez trzy oligonukleotydowe próby z udziałem DNA ligazy. W wyniku reakcji i dzięki znakowaniu fluorescencyjnemu produkty tej reakcji odczytywane są metodą elektroforezy kapilarnej w aparacie ABI PRISM 310 firmy Applied Biosystems.

Tabela II. Częstość występowania mutacji genu *CFTR* u pacjentów z azoospermia, oligozoospermia i astenoteratozoospermia.

Rodzaj zaburzenia	Liczba badanych osób (%)	Liczba stwierdzonych mutacji genu <i>CFTR</i> (%)
Azoospermia	35 (37,6%)	2 (5,7%)
Ciężka oligozoospermia	16 (17,2%)	1 (6,25%)
Oligozoospermia	21 (22,6%)	1 (4,8%)
Astenoteratozoospermia	21 (22,6%)	1 (4,8%)
Ogółem	93 (100%)	5 (5,4%)

Wyniki

W badaniach cytogenetycznych u 3 pacjentów wykazano obecność zrównoważonej translokacji. U dwóch pacjentów były to translokacje robertsonowskie [t(13;14)(q10;q10) oraz t(14;21)(q10;q10)] a u jednego wzajemna translokacja 1;19 [t(1;19)(q35;q13.3)]. Wśród pacjentów grupy badanej pojedynczą mutację F508del stwierdzono u 4 pacjentów: u dwóch pacjentów z azoospermia (u jednego z cechami azoospermii obstrukcyjnej) oraz u jednego pacjenta z oligozoospermia i jednego z astenozoospermia. (Tabela II). Heterozygotyczny wariant IVS8:7T/5T stwierdzono u jednego pacjenta z oligozoospermia.

Dyskusja

Częstość nosicielstwa mutacji genu *CFTR* w populacji rasy kaukaskiej wynosi 1/25. Najczęściej stwierdza się mutację F508del, w której delecja trzech nukleotydów w eksonie 10 prowadzi do utraty fenyloalaniny w pozycji 508 białka *CFTR*. Większość przypadków mukowiscydozy wywołana jest mutacją F508del w obu allelach genu. Obecność mutacji F508del i drugiej, innej mutacji (heterozygota złożona) jest zwykle przyczyną powstania zaburzeń o różnym nasileniu objawów i jest ono zależne od wpływu poszczególnych mutacji na budowę i funkcję kanału chlorkowego i sumy skutków jakie wywołują obie mutacje. W populacji polskiej, poza mutacją F508del, częściej niż u 1% pacjentów z mukowiscydozą stwierdza się następujące mutacje: 3949+10kbC>T (2,6%), G542X (2,5%), N1303K (1,7%), 1717-1G>A (1,7%), R553X (1,0%), *CFTR* dele2,3 (21kb) (2%) [8, 9].

W grupie pacjentów z CBAVD najczęściej stwierdza się mutacje F508del (16-83%), R117H (6-29%), G542X oraz polimorfizm IVS8-5T (12-47%). Obecność wariantu 5T/5T redukuje poziom prawidłowego białka wskutek eliminacji eksonu 9 w czasie składania RNA. Wariant ten ma niepełną penetrację i występuje zarówno u ludzi zdrowych, jak i u osób z CBAVD i nieklasycznymi postaciami mukowiscydozy. U homozygotycznych pod względem allele 5T pacjentów, nieprawidłowe mRNA ulega degradacji, co prowadzi do upośledzenia transportu jonu chloru. Jeśli współistnieje jako wariant cis z mutacją R117H to powoduje wystąpienie ciężkiej postaci CF [10].

Z uwagi na obserwowaną przez niektórych badaczy, zwiększoną częstość występowania polimorfizmu IVS8-5T u mężczyzn z CBAVD i niską częstością w populacji płodnych mężczyzn rasy kaukaskiej (około 2-10%), wariant ten

może być klasyfikowany jako słaba mutacja charakterystyczna dla CBAVD [7, 11, 12]. Warianty 7T i 9T powodują powstanie odpowiedniej ilości prawidłowego produktu białkowego.

W naszych badaniach wariant polimorficzny 5T został stwierdzony zaledwie w jednym przypadku (oligozoospermii) na 31 badanych. Nie stwierdzono obecności allele 5T u żadnego z 20 badanych pacjentów z azoospermią. Badania Kavanakisa wykazały, że polimorfizm 5T w grupie azoospermii obstrukcyjnej wystąpił u zaledwie 5% badanych, natomiast w grupie pacjentów z ciężką oligozoospermią nie stwierdzono go w żadnym badanym przypadku [10]. Badania Kusica i wsp. wykazały znacznie częstsze występowanie mutacji genu *CFTR* w grupie mężczyzn z azoospermią i oligozoospermią niż w populacji ogólnej, natomiast częstość wariantu 5T była porównywalna z częstością populacyjną [13]. Podobne wnioski z badania 50 mężczyzn z nieobstrukcyjną azoospermią wyciągnął Mak i wsp. (15).

Larriba i wsp. porównując częstość występowania IVS8-5T u mężczyzn z nieobstrukcyjną azoospermią/oligozoospermią z dwoma grupami kontrolnymi, które stanowili płodni mężczyźni ze zmianą przynajmniej dwóch parametrów nasienia oraz płodni mężczyźni bez jakichkolwiek zaburzeń w produkcji plemników stwierdzili, że częstość występowania 5T była podobna w grupie badanej (6%) i pierwszej grupie kontrolnej (7,7%). W grupie kontrolnej bez zaburzeń właściwości nasienia nie stwierdzono mutacji 5T u żadnego badanego [6].

Mutację F508del w grupie badanych przez nas mężczyzn z zaburzeniami funkcji rozrodczej obserwowaliśmy u 4,3%, a częstość wszystkich mutacji genu *CFTR* wyniosła 5,4%, co nie odbiega od częstości stwierdzanej w populacji osób zdrowych. Wyniki podobne do naszych pojawiły się w publikacjach Bouchera i wsp.

Częstość nosicielstwa mutacji genu *CFTR* w grupie chorych z oligoastenozoospermią była porównywalna z danymi uzyskanymi w populacji zdrowych i płodnych mężczyzn (mutacje występowały tu u 5,3% badanych) [5]. Dohle i wsp. badając grupę 37 mężczyzn z azoospermią i 113 z ciężką oligozoospermią stwierdzili mutacje genu *CFTR* w 14 przypadkach, co stanowi 9,3%. Jednak wśród pacjentów z ciężką oligozoospermią częstość mutacji wynosiła tylko 4,4% [14]. Wcześniejsze badania w polskiej populacji na grupie 24 mężczyzn z azoospermią przeprowadzone przez Semczuka i wsp. wykazywały, że częstość mutacji genu *CFTR* w tej grupie wynosi ok. 12,5% [2].

Sobczyńska-Tomaszewska i wsp. badając grupę pacjentów z azoospermią i kryptozoospermią stwierdzili podobną w obu grupach częstość występowania przynajmniej jednej mutacji lub wariantu IVS9-5T, natomiast wśród pacjentów z oligoastenozoospermią lub azoospermią współistniejącą z SCO (*Sertoli Cells Only*) częstość mutacji *CFTR* była częstością populacyjną. Jednak już w grupie pacjentów z azoospermią i prawidłową spermatogenezą częstość mutacji w jednym lub obu allelach genu *CFTR* była wyższa i wyniosła 55% [15].

Kavanakis stwierdził, że w grupie azoospermii obstrukcyjnej częstość mutacji *CFTR* wynosiła 30% (grupa badana liczyła tylko 10 osób), natomiast w grupie pacjentów z ciężką oligozoospermią nie stwierdził żadnej mutacji [12].

Krebsova i wsp. badając nieplodne pary w populacji czeskiej stwierdzili, że częstość mutacji F508del była wyższa wśród mężczyzn z azoospermią bez CAVD i z oligozoospermią z liczbą plemników poniżej 1 mln w ml. W grupie mężczyzn, u których liczba plemników była wyższa niż 1mln/ml nie stwierdzono zwiększonej częstości mutacji genu *CFTR* [16].

Badania zależności mutacji genu *CFTR* z niepłodnością u mężczyzn bez CBAVD wykazują, że pojedyncza mutacja w genie *CFTR* występuje u mężczyzn z idiopatyczną niepłodnością rzadziej niż u mężczyzn z azoospermią obstrukcyjną [5, 17].

Wśród badanych przez nas pacjentów u jednego chorego stwierdziliśmy agenezję jednostronną nerki, a u drugiego zdwojony układ kielichowo-miedniczkowy po jednej stronie. U obu pacjentów nie stwierdzono mutacji genu *CFTR*.

Opisane w literaturze przypadki CBAVD i CUAVD, współistniejące z agenezją nerki wskazują, że nie są one związane z mutacjami genu *CFTR* [18]. U pacjentów z CBAVD i CUAVD zmiany dotyczą układu rozrodczego, ale nie moczowego i powstają już po rozdzieleniu obu tych układów. Prawdopodobnie dochodzi do zamknięcia przewodów Wolffa w okresie życia wewnątrzmacicznego z powodu zaburzeń wywołanych mutacją genu *CFTR* i dysfunkcją kanału chlorkowego, co doprowadza do odwodnienia i przesunięcia płynu wewnątrzłonowego i wtórnie do zmian degeneracyjnych lub zarostania światła przewodów Wolffa [18].

W chwili obecnej wydaje się, że nie ma istotnej zależności między mutacjami genu *CFTR* a zaburzeniem spermatogenezy u mężczyzn z azoospermią nieobstrukcyjną i zaburzeniem procesu tworzenia i dojrzewania plemników u mężczyzn z oligozoospermią i oligoastenozoospermią. Dotychczasowe wyniki nie potwierdziły znaczącego wpływu tych mutacji na proces tworzenia plemników [5, 19].

Udowodniony wydaje się być tylko wpływ mutacji genu *CFTR* na powstanie zaburzeń związanych z brakiem lub zanikiem struktur powstających z przewodu Wolffa [7, 20]. 50-82% mężczyzn z CBAVD ma przynajmniej jedną mutację w genie *CFTR*, a 10% ma mutacje w obu allelach [7]. W przypadku CUAVD stwierdzono, że 43% pacjentów ma przynajmniej jedną mutację genu *CFTR* [7].

Szybki rozwój nowoczesnych technik wspomaganego rozrodu stwarza szansę na posiadanie potomstwa także w przypadku mężczyzn z azoospermią obstrukcyjną i CBAVD. Pobranie plemników podczas biopsji jądra lub najądrza pozwala na ich użycie do zapłodnienia komórki jajowej *in vitro* przy pomocy techniki ICSI (*intracytoplasmic sperm injection*). Algorytm postępowania diagnostycznego w takich przypadkach powinien uwzględniać także konieczność przeprowadzenia diagnostyki mutacji genu *CFTR*.

Wnioski

Częstość stwierdzonych mutacji genu *CFTR* nie różni się w badanych przez nas grupach pacjentów z nieobstrukcyjną azoospermią, oligozoospermią i astenozoospermią i jest podobna do tej obserwowanej w populacji ogólnej.

Piśmiennictwo

1. Sanocka D, Kurpisz M. Infertility in Poland- present status, reasons and prognosis as a reflection of Central and Eastern Europe problems with reproduction. *Med Sci Monit.* 2003, 9, SR16-SR20.
2. Semczuk M, Kostuch M, Krzyżanowski A, [et al.]. Identyfikacja mutacji genu CFTR u mężczyzn z azoospermią. *Ginekol Pol.* 1998, 69, 506-511.
3. Bernardino A, Lima C, Zatz M. Analysis of mutations in the cystic fibrosis transmembrane regulator (CFTR) gene in patients with obstructive azoospermia. *Genet Mol Biol.* 2003, 26, 1-3.
4. Stuhmann M, D'Erk T. CFTR gene mutations and male infertility. *Andrologia.* 2000, 32, 71-83.
5. Boucher D, Creveaux I, Grizard G, [et al.]. Screening for cystic fibrosis transmembrane conductance regulator gene mutations in men included in an intracytoplasmic sperm injection programme. *Mol Hum Reprod.* 1999, 5, 587-593.
6. Larriba S, Bonache S, Sarquella J, [et al.]. Molecular evaluation of CFTR sequence variants in male infertility of testicular origin. *Int J Androl.* 2005, 28, 284-290.
7. Mak V, Zielenski J, Tsui L, [et al.]. Proportion of cystic fibrosis gene mutations not detected by routine testing in men with obstructive azoospermia. *JAMA.* 1999, 281, 2217-2224.
8. Dequeker E, Cuppens H, Dodge J, [et al.]. Recommendations for quality improvement in genetic testing for cystic fibrosis European Concerted Action on Cystic Fibrosis. *Eur J Hum Genet.* 2000, 8, suppl 2, S2-S24.
9. Dork T, Macek M, Mekus, [et al.]. Characterisation of a novel 21-kb deletion, CFTR dele2,3(21kb), in the CFTR gene: a cystic fibrosis mutation of Slavic origin common in Central and East Europe. *Hum Genet.* 2000, 106, 259-268.
10. Kanavakis E, Tzetzis M, Antoniadis T, [et al.]. Cystic fibrosis mutation screening in CBAVD patients and men with obstructive azoospermia or severe oligospermia. *Mol Hum Reprod.* 1998, 4, 333-337.
11. Chillon M, Casals T, Mercier B, [et al.]. Mutations in the cystic fibrosis gene in patients with congenital absence of vas deferens. *N Engl J Med.* 1995, 332, 1475-1480.
12. Grangeia A, Niel F, Carvalho F, [et al.]. Characterisation of cystic fibrosis conductance transmembrane regulator gene mutations and IVS8 poly(T) variants in Portuguese patients with congenital absence of the vas deferens. *Hum Reprod.* 2004, 19, 2502-2508.
13. Kusic J, Radojkovic D, Maletic V, [et al.]. Mutations and polymorphisms in CFTR gene in infertile men with oligospermia and azoospermia. *Srp Arh Celok Lek.* 2002, 130, 1-6.
14. Dohle G, Halley DJ, Van Hemel J, [et al.]. Genetic risk factors in infertile men with severe oligozoospermia and azoospermia. *Hum Reprod.* 2002, 17, 13-16.
15. Sobczyńska-Tomaszewska A, Bak D, Wolski J, [et al.]. Molecular analysis of defects in the CFTR gene and AZF locus of the Y chromosome in male infertility. *J Reprod Med.* 2006, 51, 120-127.
16. Krebsova A, Fialova M, Macek M, [et al.]. Increased frequency of F508 mutation carriers in men with non-obstructive azoospermia. *Cs Pediatr.* 1999, 54, 196-200.
17. von Eckardstein S, Cooper T, Rutsch K, [et al.]. Seminal plasma characteristics as indicators of cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (CFTR) gene mutations in men with obstructive azoospermia. *Fert Steril.* 2000, 73, 1226-1231.
18. Mak V, Jarvi K. The genetics of male infertility. *J Urol.* 1996, 156, 1245-1256.
19. Sobczyńska-Tomaszewska A, Wolski J, Bal J. Identyfikacja mutacji i zmian polimorficznych w genie CFTR u pacjentów z azoospermią obstrukcyjną. *Wiad Lek.* 2000, 53, 644-651.
20. Jezequel P, Bubourg C, Le Lannou D, [et al.]. Molecular screening of the CFTR gene in men with anomalies of the vas deferens: identification of three novel mutations. *Mol Hum Reprod.* 2000, 6, 1063-1067.