

SEMMELWEIS EGYETEM

DOKTORI ISKOLA

Ph.D. értekezések

2519.

BABAY LILLA

Reproduktív medicina

című program

Programvezető: Dr. Rigó János, egyetemi tanár

Témavezető: Dr. Nagy Gyula Richárd, egyetemi docens

Az aneuploidiák hátterének vizsgálata a petesejt mozaicizmus modell kapcsán

Doktori értekezés

Dr. Babay Lilla Éva

Semmelweis Egyetem

Klinikai orvostudományok Doktori Iskola



Témavezető: Dr. Nagy Gyula Richárd, Ph.D., egyetemi docens

Hivatalos bírálók: Dr. Tóth Zoltán, D.Sc., egyetemi tanár

Dr. Terebessy András, Ph.D., egyetemi adjunktus

Szigorlati bizottság elnöke: Dr. Szijártó Attila, D.Sc., egyetemi tanár

Szigorlati bizottság tagjai: Dr. Belics Zorán, Ph.D., főorvos

Dr. Sobel Gábor, Ph.D., egyetemi docens

Budapest

2020

Tartalomjegyzék

1. BEVEZETÉS	3
1.1. AZ ÖRÖKLŐDÉS KROMOSZÓMAELMÉLETE, A MITÓZIS ÉS MEIÓZIS ISMERTETÉSE	4
1.2. OOGENESIS	10
1.3. A KROMOSZÓMÁK SZÁMBELI RENDELLENESÉGEI, A LEGGYAKORIBB ANEUPLOIDIÁK	13
1.3.1. Down-szindróma	13
1.3.2. Edwards-szindróma	15
1.3.3. Patau-szindróma	15
1.3.4. Klinefelter-szindróma	16
1.3.5. Turner-szindróma	18
1.3.6. Tripla X-szindróma	19
1.4. AZ ANEUPLOIDIÁK KÓRÉLETTANA: A KLASSZIKUS EREDETMODELL ÉS HIPOTÉZISEK AZ ANYAI ÉLETKORRAL VALÓ KAPCSOLATÁRA	20
1.5. A PETESEJT MOZAICIZMUS MODELL LEÍRÁSA ÉS BIZONYÍTÁSA DOWN-SZINDRÓMA ESETÉN	26
2. CÉLKITŰZÉSEK	30
3. MÓDSZEREK	32
3.1. A MAGZATI PETEFÉSZKEK VIZSGÁLATA	32
3.2. PREMEIOTIKUS MITOTIKUS ÉS MEIÓZISBAN LÉVŐ SEJTEK ELKÜLÖNÍTÉSE	33
3.3. A 13-AS TRISZÓMIÁS SEJTEK ARÁNYÁNAK MEGHATÁROZÁSA	37
4. EREDMÉNYEK	43
4.1. MAGZATI PETEFÉSZKEK VIZSGÁLATA	43
4.2. A STAG3 POZITÍV ÉS STAG3 NEGATÍV SEJTEK ELVÁLASZTÁSA	44
4.3. A 13-AS TRISZÓMIÁS SEJTEK ARÁNYÁNAK MEGÁLLAPÍTÁSA	45
5. MEGBESZÉLÉS	52
6. KÖVETKEZTETÉSEK	59
7. ÖSSZEFOGLALÁS	61
8. SUMMARY	62
9. IRODALOMJEGYZÉK	62
10. SAJÁT PUBLIKÁCIÓK JEGYZÉKE	71
10.1. AZ ÉRTEKEZÉS TÉMÁJÁBAN MEGJELENT EREDETI KÖZLEMÉNYEK	71
11. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS	72

Rövidítések jegyzéke

APP	amiloid prekursor protein (amiloid precursor protein)
CCD	töltés-csatolt eszköz (charge coupled device)
DAPI	4',6-diamidino-2-phenylindole
DNS	dezoxiribonukleinsav
DS	Down-szindróma
FISH	fluorescens in situ hibridizáció (fluorescent in situ hybridization)
FSH	follikulus stimuláló hormon (folliculus stimulating hormone)
GnRH	gonadotropin-fel szabadító hormon (gonadotropin releasing hormone)
LH	luteinizáló hormon (luteinizing hormone)
STAG3	stromal antigen 3
OAC	orális antikoncipiens (oral anticoncipient)
OMI	oocyta érési inhibitor (oocyte maturation inhibitor)
OMM	petesejt mozaicizmus modell (ovarian mosaicism model)
PBS	phosphate buffered saline

1. Bevezetés

A perinatális veszteségek és a veleszületett súlyos mentális retardációk háttérben igen gyakran állnak kromoszóma rendellenességek. Születés kori gyakoriságuk 1:180 és ezek körülbelül kétharmadát az aneuploidiák és a polyploidiák teszik ki. (Az aneuploidia az autoszomális és nemi kromoszómák számbeli anomáliája, míg a polyploidia az érett ivarsejtekben lévő 23 kromoszóma egész számú többszörösére növekedett génállományt jelenti.) Bizonyos becslések szerint az összes fogamzásra vonatkoztatva a kromoszóma rendellenességek akár 75%-ban is megjelennek, de mivel ezek a zigóták csökkent életképességűek, ezért ezek a rendellenességek már embrionális korban is kisebb százalékban mutathatók ki, arányuk a terhesség előrehaladtával pedig spontán szelekció eredményeképpen folyamatosan csökken. A korai vetélések 60%-ban, a közepidős veszteségek 4-5%-ban, míg a halvaszületések 5-6%-ban igazolható kromoszóma rendellenességek (Papp Z, 2009).

Pylyp és mtsai 2018-ban végzett vizsgálatukban arra jutottak, hogy a fogantatások 50%-a spontán vetéléssel végződik, kb. 60%-ban triszómiák, 22%-ban poliploidia, 7,5%-ban monoszómia, 7%-ban kiegyensúlyozatlan szerkezeti eltérés és 3,8%-ban többszörös aneuploidia igazolódott (Pylyp és mtsai, 2018).

A gyakori triszómiák eredete az intenzív kutatások ellenére sem tisztázott egyértelműen. A jelenleg széles körben elfogadott klasszikus eredetmodell szerint a meiotikus non-diszjunkció okozhatja a triszómiát egy eredetileg diszómias petesejtben. Újabb kutatások szerint azonban eltérő hatásmechanizmus állhat bizonyos aneuploidiák háttérében.

Doktori értekezésemben az elméleti alapok és az új hipotézis bemutatását követően térek rá kutatásunk ismertetésére, melynek lényege az elmélet szélesebb körű, több kromoszómára kiterjedő bizonyítása volt.

1.1. Az öröklődés kromoszómaelmélete, a mitózis és meiózis ismertetése

Az egyed jellegzetességeit az anyától és apától örökölt kromoszómák specifikus génjei határozzák meg. Az ember 46 kromoszómája mintegy 35 ezer gén hordozásáért felelős. A testi sejtekben a homológ kromoszómák 23 párban vannak jelen (22 pár autoszóma, és 1 pár szexkromoszóma formájában), ezeket nevezzük diploid sejteknek.

Mindegyik pár egyik kromoszómája az anyai ivarsejtből (petesejt, oocyta) és az apai ivarsejtből (ondósejt, spermium) származik, így minden egyes ivarsejt haploid, 23 darab kromoszómát tartalmaz, s a megtermékenyítéskor történő egyesülésük felelős a diploid autoszomális sejtekre jellemző kromoszómaszám visszaállításáért (Sadler és mtsai, 2018).

A mitózis során a sejt két, szülősejttel genetikailag azonos leánysejtté osztódik. Mindkét utódsejt az eredeti, 46 kromoszómából álló genetikai állományt tartalmazza. A mitózis megkezdése előtt a kromoszómák DNS-e megkettőződik, hisztonok és egyéb fehérjék kötődnek a DNS szálakhoz, de a kromoszómák önálló képletként nem ismerhetők fel. A nucleolus, azaz sejtmagvacska az egyetlen képlet, ami fénymikroszkóp alatt látható. Mindkét centriolumra merőlegesen egy-egy utódcentriolum alakul ki. A korai profázisban a centriolumok a sejt két pólusa felé húzódnak, a kromoszómák hosszú fonalak formájában jelennek meg, a nucleolus egyre inkább elhalványodik. A profázis középső szakaszában a kromoszómák kondenzációja befejeződik, mindegyik kromoszóma két kromatidából áll, amelyek a centroméráknál függenek össze. Mindegyik centroméra a frissen megkettőződött DNS-molekula egyikét tartalmazza. A pólusok felé közeledő centriolumokból oszlási orsó kezd mikrotubulusokból képződni. A késői profázisban a centriolumok eléri a sejt pólusait, egyes mikrotubulusok a pólustól a sejt egyenlítője felé néznek, míg mások a kromoszómák centromérához közeli régiójában helyezkednek el. A maghártya oszlásnak indul, majd eltűnik, ekkor a sejtmagvacska már nem látható (Sadler és mtsai, 2018).

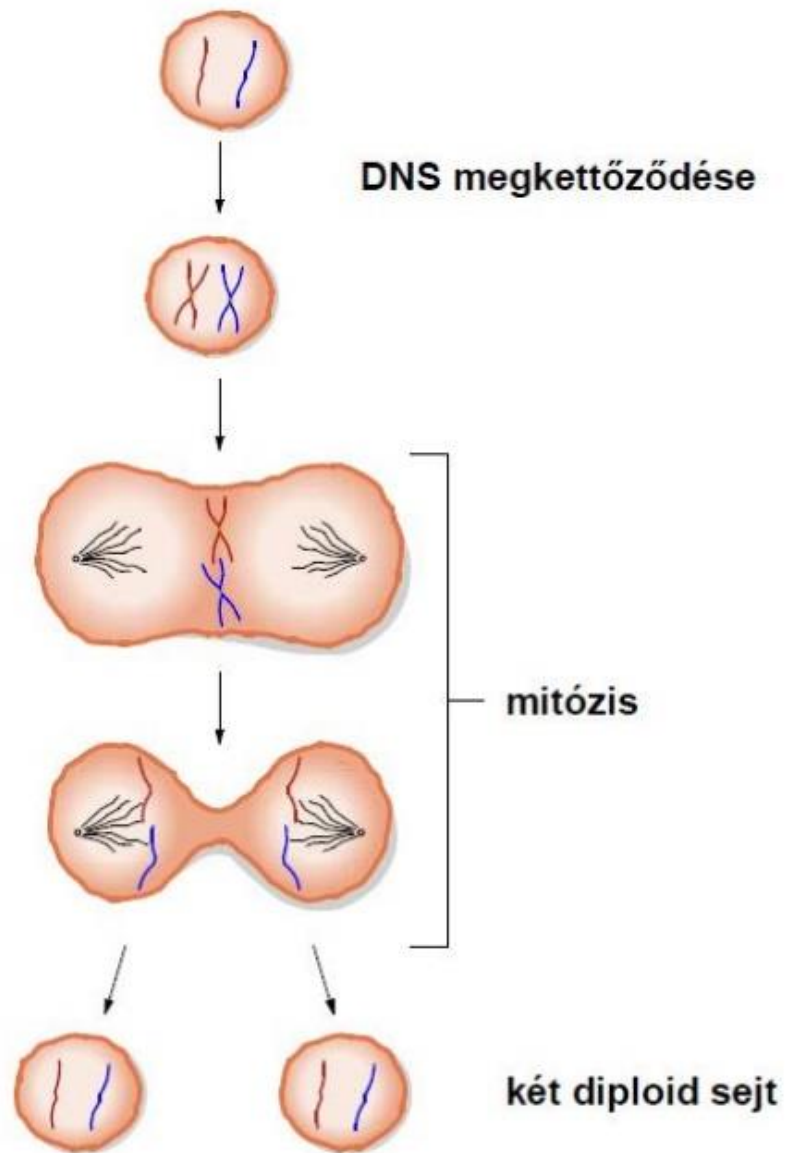
A metafázis alatt a kromoszómák a sejt egyenlítői síkjába rendeződnek, azonban a testvérkromatidák még nem válnak szét.

Az anafázis korai szakaszában a két testvérkromatida szétválik, centromérájuk egy húzóroston kapcsolódik valamelyik sejtpólushoz. A centroméránál fogva minden egyes kromoszóma a vele összeköttetésben álló sejtpólus felé vándorol, ekkor a sejt

megnyúlik, szétváláshoz készül. Az anafázis késői szakaszában mindegyik kromoszómarészlet közeledik a pólusához és megkezdődik a citokinézis, azaz sejtszétválás az oszlási barázda kialakulásával. (Okhura, 2018)

A telofázisban az utódsejtmagok körül új maghártya keletkezik, a kromoszómák letekerednek és kevésbé elkülöníthetőké válnak, a magvacska azonban ismét előtűnik. A mitózis során mindkét póluson az utódcentriolumok eléri teljes nagyságukat. A telofázisban az eredeti centriolumok megkettőződése befejeződik, s mindkét póluson két-két centriolum a rájuk merőlegesen egy-egy új utódcentriolumot hoz létre. A citokinézis csaknem teljesen befejeződik, a mikrotubulusok depolimerizálódnak, az oszlási orsó eltűnik. A citokinézis befejezésekor a DNS replikáció ismét újakezdődik (Papp Z és Tóth Z, 2009).

A replikációs fázis alatt a kromoszómák hosszúak, diffúzan szétszóródnak a sejtmagban és fénymikroszkóppal nem láthatóak. Mindegyik utódsejt a megkettőződött kromoszómaállomány felét kapja, így megegyező számú kromoszómával rendelkezik majd, mint az anyasejt (Sadler és mtsai, 2018). (1. ábra)



- 1. ábra: A mitózis.** Másnéven számtartó osztódás. A sejtosztódás során az utódsejtek és a kiindulási sejtek kromoszómaszáma megegyezik. A folyamat során a sejtciklus nyugalmi szakaszában a megkettőződött DNS tartalmú kromoszómák kromatidái elválnak egymástól és a két utódsejt között egyenlő arányban oszlanak meg. (Horányi D, 2019)

A férfi és női ivarsejtek keletkezéséért felelős sejtosztódási folyamat a meiózis. A haploid kromoszómaszám kialakításához számfelező osztódásnak kell végbemennie. A kromoszómák számának felezéséért a meiózis két sejtosztódási lépése: a meiózis I. és meiózis II. felelős, ekkor a kromoszómák száma 46-ról 23-ra változik. A mitózishoz hasonlóan a meiózis I. elején a DNS megkettőződése történik, ezáltal a 46 kromoszóma mindegyike testvérkromatidokká válik. A lényegi különbség ezt követően történik meg: a mitózissal ellentétben azonban a homológ kromoszómák a szinapszis folyamata során párokba rendeződnek. A párba állásra a szimmetria a jellemző (itt kivételt képez az XY kombináció). A homológ párok ezután szétválnak, majd külön-külön a két utódsejtbe kerülnek, így a diploid kromoszómaszám haploiddá feleződik (Sadler és mtsai, 2018).

A meiózis első szakaszának korai profázisában a kromoszómák már megkétszereződtek, de a kromatidák párban maradnak és nem különíthetők el a profázis I. késői szakaszáig. A kromatidapárok feltekeredett szálként vannak jelen. A profázis I. középső szakaszában a homológ kromoszómák teljes hosszukban szinapszist képeznek, kondenzálódnak és megrövidülnek. A homológ kromoszómák kromatidái között ebben a szakaszban történik a crossing over. A crossing over a meiózis központi eseménye, a párokba rendeződött homológ kromoszómák között egyes kromatidaszegmentek kicserélődéséért felelős. A kromatidák szegmensei letörnek, majd kicserélődnek a homológ kromoszómák szeparációja során. Amint a szeparáció megtörténik, a cserepontok ideiglenesen egyesülnek, chiasmákat képeznek. Kromoszómánként körülbelül 1-2 kereszteződés jön létre, leggyakrabban a kromoszómán egymástól meglehetősen távol lévő gének között. A crossing over révén ezáltal új genetikai információt hordozó kromoszómák jönnek létre, ami a genetikai anyagot meglehetősen átrendezi (Ohkura, 2015).

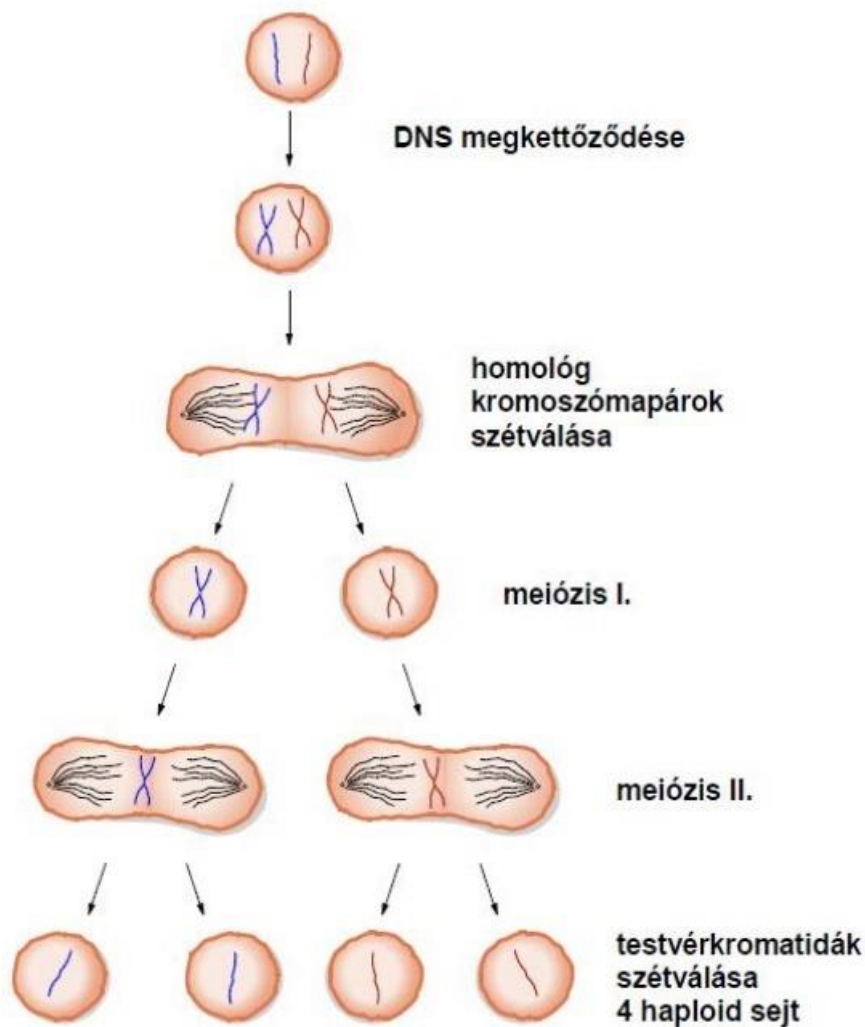
A késői profázisban a kromoszómapárok vándorolni kezdenek a sejt egyenlítői síkjára felé, az oszlási orsó eddigre majdnem kialakul és a maghártya fokozatosan eltűnik.

A metafázis I-ben a kromoszómapárok az egyenlítői síkba rendeződnek.

Az anafázis I. során a leánykromatidák a centroméráknál összeköttetésben maradnak egymással, a kromoszómapárok szétválnak és mindegyik pár kromoszómái a sejt két ellentétes pólusa felé vándorolnak.

A telofázis I-ben a kromoszómák körül maghártya alakul ki, a kromatidák a centroméráknál azonban még mindig összeköttetésben maradnak (Uhlmann, 1998).

Az interfázisban a haploid sejtek kialakulása befejeződik, további DNS-replikáció már nem történik. A kromoszómák kissé dekonzenzálnak és fénymikroszkóppal láthatatlanná válhatnak. A második meiotikus osztódás a mitózishoz hasonlóan zajló események sora, amikor a testvérkromatidák szétválnak és mindegyik pár egy-egy tagja kerül az utódsejtekbe, ezáltal az ivarsejtek mindegyike haploid kromoszóma garnitúrával rendelkezik és csak a megtermékenyítés során, a zigótában nyerik vissza a diploid, 46 kromoszómával rendelkező szomatikus sejt állapotot (Papp Z és Tóth Z, 2009). (2. ábra)



2. **ábra: A meiózis.** Másnéven számfelező osztódás. A férfi és női ivarsejtek keletkezéséért felelős folyamat során a kétszeres kromoszómakészletű ($2n$), diploid sejtekből, egyszeres kromoszómakészletű haploid sejtek (n) lesznek. (Horányi D, 2019)

1.2. Oogenesis

Szövettanilag a petefészek a terhesség 70. napjától észlelhető, ekkor 3 sejttípus alkotja: a cöloma hámsejtjei, amiből később a granulózasejtek fejlődnek ki, a mesenchimális sejtek, amikből a stróma képződik és az endodermális eredetű primitív csírasejtek, amelyekből a petesejtek alakulnak ki. Amikor a primordiális csírasejtek az egyedfejlődés korai szakaszában a nőnemű gonádba vándorolnak, azonnal oogoniumokká differenciálódnak. A sejtek számos mitotikus osztódáson mennek keresztül és a 12. terhességi hét végére egy réteg laphámsejttel körbevett csomókká rendeződnek. Minden csomó oogoniumai valószínűsíthetően egy primordiális csírasejtből, a folliculus hámsejtek pedig az ováriumot borító felszínes cölómahámból származnak. Az oogoniumok egy részében a meiotikus osztódások során a profázis I szakaszában a sejtosztódás leáll, az oogonium primer oocytává alakul. A következő néhány hónapban az oogoniumok száma meredeken emelkedik, a prenatális fejlődés 5. hónapjára a csírasejtek száma eléri 7-10 milliós maximumát. Ekkor az oogoniumokat sújtó apoptózis beindul, ennek során számos oogonium és primer oocyta atretizál (Sanchez, 2012).

A 7. hónapra az oogoniumok és oocyták nagy mennyiségben degenerálódnak, valamennyi túlélő oocyta belép az első meiotikus osztódás profázisába, külsejüket egyrétegű laphám borítja. Ezt a komplexumot nevezzük primordiális tüszőnek. A születés idejéhez közeledve valamennyi primer oocyta belép a meiózis I profázisába, ekkor kulcsfontosságú lépés történik: ahelyett, hogy továbbhaladna a metafázisba, diplotén állapotában nyugalmi szakaszba kerül. A primer oocyták a profázisban maradnak és nem fejezik be első meiotikus osztódásukat a pubertásig. Ennek hátterében az oocyta érési inhibitor (OMI) szerepel, mely a folliculussejtek által termelt fehérje (Sadler, 2018).

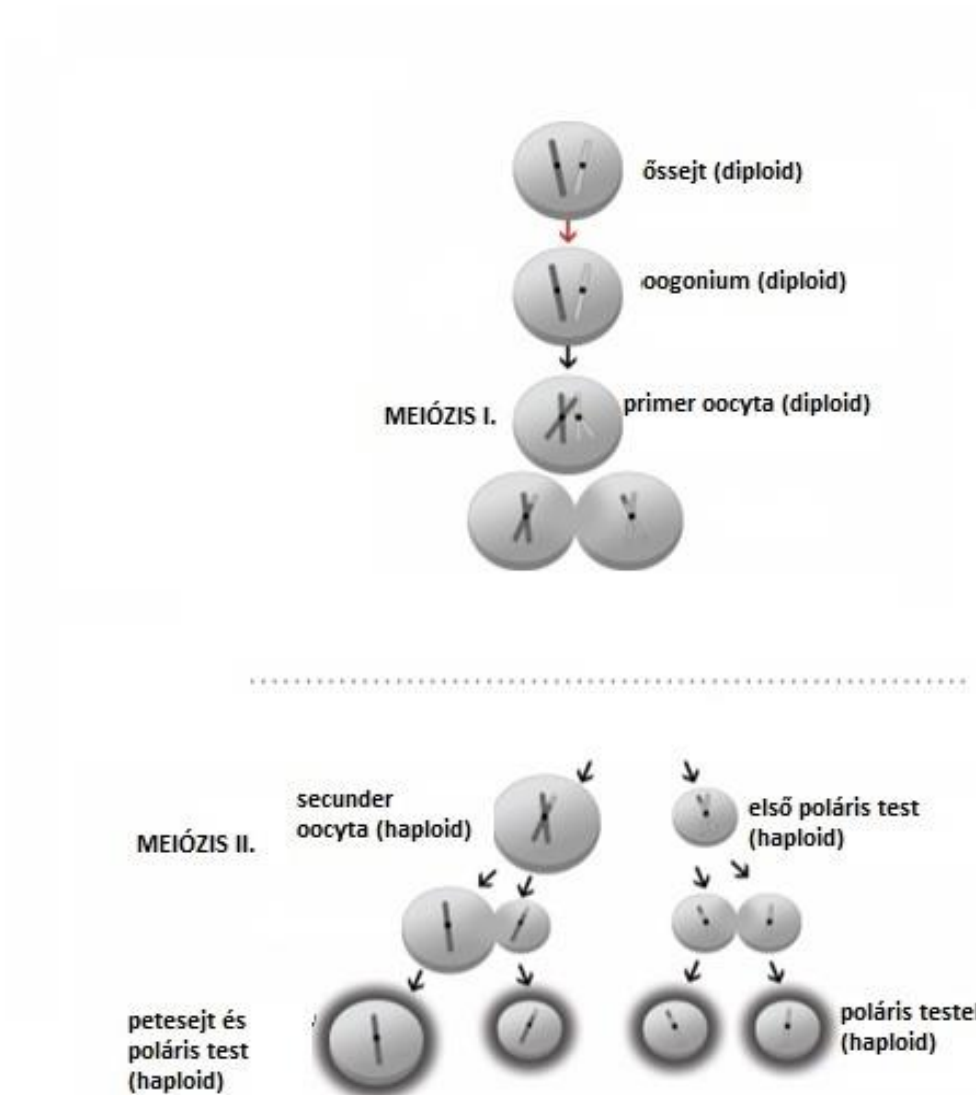
A primer oocyták száma születéskor 600-800 ezer, ez a pubertás kezdetére 400 ezerre redukálódik, ebből azonban mindössze 500 jut el az ovulációig (Papp Z, 2009).

A pubertáskor kezdetén a növekvő folliculusokból egy pool alakul ki, mely folyamatos utánpótlásban részesül a primordiális tüszőkből. Amint a primer oocyta növekedni kezd, az őt körülvevő folliculus-laphámsejtek köbhámmá alakulnak és proliferációjuk során többrétegű granulosa sejtréteget alakítanak ki: a komplexum neve primordiális folliculus. A granulosa sejteket a thecasejtektől basalis membrán választja el. A thecasejtek a folliculus növekedése során külső és belső rétegre különülnek el (theca

externa, illetve szteroidszekrécióért felelős theca interna). A folliculus fejlődése során a granulosa-sejtek között folyadék-tartalmú üregek jelennek meg, az üregek összeolvadása létrehozza az antrumot, ekkor a folliculust szekunder folliculusnak nevezik. Az oocytát körülvevő granulosa-sejtek érintetlenek maradnak, a cumulus oophorus alakítják ki. Az érett szekunder folliculus 25 mm nagyságot is elérhet.

Minden ovarialis ciklusban több folliculus indul fejlődésnek, azonban az esetek legnagyobb részében csak egy éri el a teljes érettséget. A szekunder, érett folliculusban luteinizáló hormon (LH) hatására a meiózis I befejeződik, ennek során két, összességében 46 kromoszómát tartalmazó leánysejt keletkezik: a szekunder oocyta és az első sarki test. A sejtek ezt követően belépnek a meiózis II fázisába, a folyamat azonban a metafázis során (az ovulációt közvetlenül megelőzve) blokkolódik (Pepling, 2006).

A meiózis II csak az oocyta megtermékenyítésekor fejeződik be, a végeredmény ekkor egy, 23 kromoszómát tartalmazó oocyta és 3 sarki test lesz (ezzel ellentétben a spermatogenesis során a primer spermatocytából 4 spermatocytá jön létre, kettő 22+1X, kettő pedig 22+1Y kromoszómával). Amennyiben a megtermékenyítés nem következik be, az oocyta kb. 24 óra alatt degenerálódik (Sadler és mtsai, 2018). (3. ábra)



3. ábra. Oogenesis. A primordiális őssejtekből, melyek $2n$ kromoszómakészletűek, számtartó osztódásokat és a gonadokba vándorlást követően oogoniumok alakulnak ki. Az meiotikus osztódások során a profázis I szakaszában a sejtosztódás leáll, az oogonium primer oocytává alakul. A születéshez közeledve minden primer oocyta belép a meiózis profázisába, majd diplotén állapotában nyugalmi szakaszba kerül. A peteérés során a szekunder, érett folliculusban a meiózis I befejeződik, ennek során két, haploid sejt keletkezik: a szekunder oocyta és az első sarki test. A sejtek ezt követően belépnek a meiózis II fázisába, a folyamat azonban csak az oocyta megtermékenyítésekor fejeződik be, a végeredmény ekkor egy, 23 kromoszómát tartalmazó petesejt és 3 poláris test lesz. (saját ábra)

1.3. A kromoszómák számbeli rendellenességei, a leggyakoribb aneuploidiák

A normális szomatikus sejtek 46 kromoszómát, míg az ép gaméták 23 kromoszómát tartalmaznak. A normális szomatikus sejtek ezáltal diploidok ($2n$), míg a gaméták haploidok (n). Az euploidia az n egész számú többszörösét fejezi ki, ezáltal minden kromoszómából azonos számú van a sejtben. Az aneuploidia azt fejezi ki, hogy a kromoszómaszám az alaptól egy vagy több kromoszómával eltér, ilyen lehet a triszómia ($2n+1$), vagy a monoszómia ($2n-1$). A kromoszómaszámok abnormalitásai létrejöhetnek meiotikus és mitotikus osztódás során is (Papp Z, 2009).

A mitotikus non-diszjunkció szomatikus sejteket és gamétákat és érinthet, ez a legkorábbi embrionális sejtosztódásokra jellemző: az ilyen állapot mozaicizmust eredményez, ennek során egyes sejtek abnormális kromoszómaszámmal bírnak, míg más sejtek teljesen normálisak (Allen, 2009).

A meiotikus non-diszjunkció csak gamétákat érint: itt meg kell különböztessünk első és második meiotikus osztódás során bekövetkezett kóros állapotot, az eredmény azonban mindkét esetben 24 vagy 22 kromoszómás gamétát eredményez majd (Sadler és munkatársai, 2018).

1.3.1. Down-szindróma

A Down-szindróma a 21-es kromoszóma triszómiájával járó tünetegyüttes. A 1:800 élveszületési gyakoriságával jelenleg a leggyakoribb szomatikus aneuploidia (Merrick, 2000). (4. ábra)

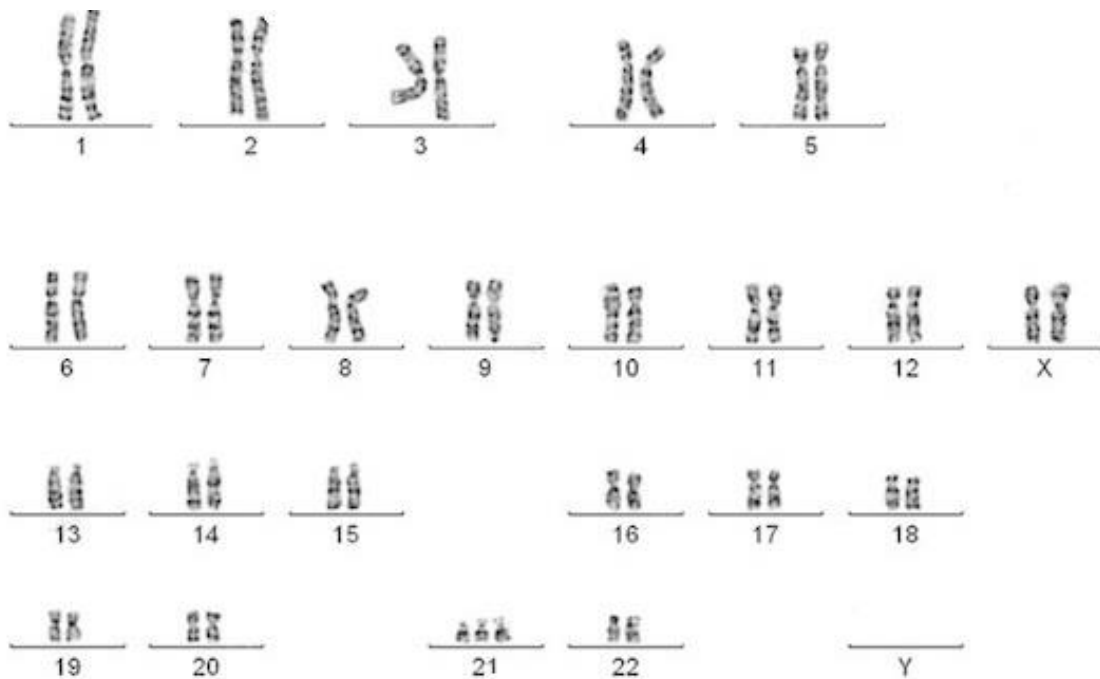
Az ilyen rendellenességgel született újszülöttek arctájékán gyakran észlelhető jellegzetes eltérés a mongoloid szemrés, a brachycephalia, a lapos arcél, az epicanthus és a hypertelorismus, a kicsi és mélyen elhelyezkedő fülkagyló, a kicsi orr, ezen kívül a szájüreget teljesen kitöltő és abból gyakran ki is lógó, fissa nélkülű nyelv. Ezen újszülöttek tarkója lapos, rajta a bőr gyakran redőbe emelhető (Roizen, 2003).

A kéz széles, rajta az esetek 50%-ában négyujjas harántredő („majombarázda”) észlelhető. Az ujjak rövidek, az V. ujj sokszor csak két ujjpercből áll. A nagylábujj mellett hasadék ismerhető fel, gyakori a talpon a plantaris árok megjelenése („szandálredő”). Az újszülött izmai hypotóniásak, ízületei lazák.

A betegséghez gyakran társulnak olyan szívfejlődési rendellenességek, mint Fallot-tetralógia, kamrai sövényhiány és endocardiális párnadefektus, valamint duodenum atresia, szemészeti rendellenességek (strabismus, cataracta), valamint fokozott hajlam bizonyos leukémiákra is (Freeman, 1998).

Csökkenett immunitás jellemzi az alacsonyabb IgG, IgM és IgE szintek miatt. A jelentkező neurondegeneráció miatt és az amiloid prekursor fehérje (APP) kóros hasadása következtében béta-A4-peptid keletkezik, ami amiloid plakkok kialakulását, ezáltal kardiovaszkuláris eltérések egész sorát eredményezi (Busciglio, 2002).

A betegség minden esetben szellemi fogyatékossgal jár, az újszülöttek már születésük után feltűnően nyugodtak, keveset sírnak (Barlow, 2002).



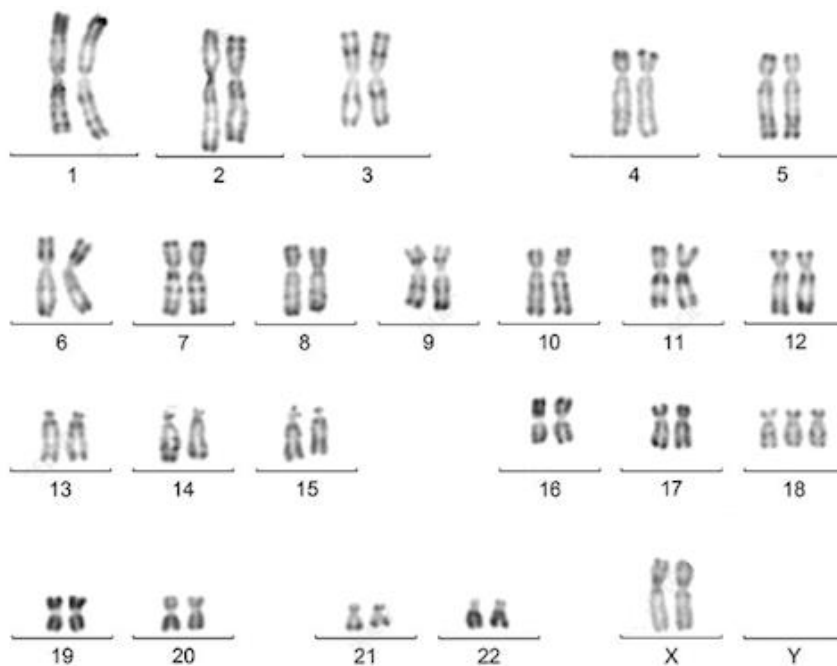
4. ábra. 21-es triszómia karyogramja (saját ábra)

1.3.2. Edwards-szindróma

Az Edwards-szindróma a 18-as kromoszóma triszómiájával járó betegség. Az 1:3000 élveszületési gyakoriságú szindróma nevét Edwards angol genetikusról kapta. A rendellenesség jellemzői a növekedési retardáció, bizonyos koponyaeltérések, mint a keskeny ornyereg, rövid homlokredők, az occiput előemelkedése, kis áll és micrognatia, valamint az alacsonyan ülő és normálistól eltérő alakú fülek (Papp Z, 2009). (5. ábra)

Az újszülött kezén felfedezhető rendellenességek az egymásra hajló ujjak, esetleges majombarázda és a rendellenes bőrlécrajzolat. A 18-as triszómiás újszülött talpa domború, felfelé deviáló sarokkal. Fiúgyermeknél criptorchismus fordulhat elő. A különféle szív és vesefejlődési rendellenességek gyakori társbetegségek, a szemeken veleszületett corneahomály, coloboma, cataracta, esetleg microphthalmia fordulhat elő (Cereda, 2012).

Az Edwards-szindróma egy nagyon súlyos rendellenesség, a magzatok 95 %-a már méhen belül elhal, az élve született gyermekek 90 %-át pedig az első év alatt elveszítjük (Batees, 2014).



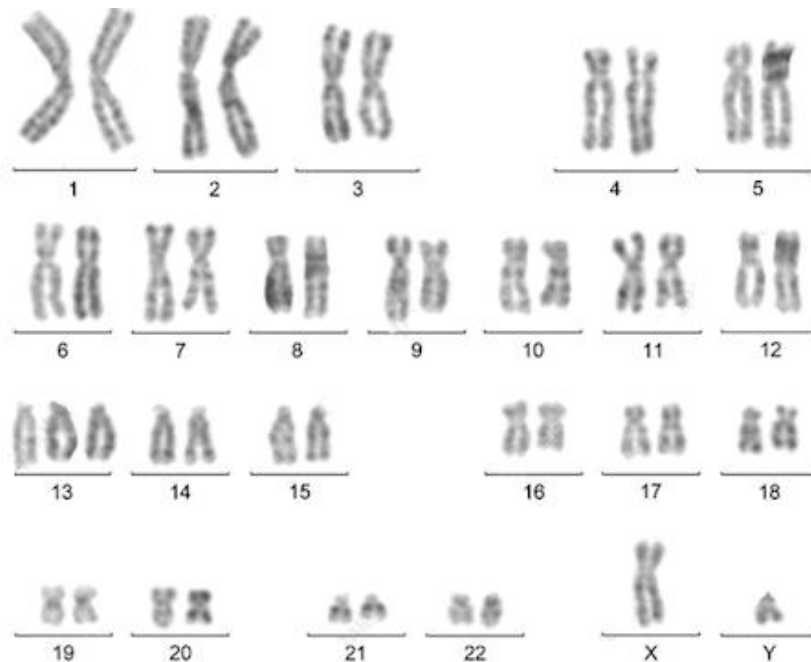
5. ábra. 18-as triszómia karyogramja (saját ábra)

1.3.3. Patau-szindróma

A Patau-szindróma a 13-as kromoszóma triszómiája miatt kialakult rendellenesség. A betegség előfordulása 1:10000 élveszületés (Patau, 1960). (6. ábra)

Jellemzői a növekedési visszamaradottság, a koponya deformitásai, melyek járhatnak akár holoprosencephalia-szekvenciával, eltérő morfológiájú fülekkel, hypotelorismussal is. Szemfejlődési rendellenesség gyakran jelenik meg coloboma, retinoblastoma, szürkehályog képében. Szívfejlődési rendellenesség, születés után sükettség, vakság, mentális retardáció észlelhető (Plaiasu, 2010).

Patogenezisében (a jelenleg elfogadott teória szerint) meiotikus non-diszjunkció, transzlokáció és mozaikosság is előfordulhat. A Patau-szindrómás magzatok 99 %-a koraterhességben spontán vetélés kíséretében méhen belül elhal, a megszületett csecsemőknél pedig az egy éves túlélés esélye elenyésző (Williams, 2020).



6. ábra: 13-as triszómia karyogramja (saját ábra)

1.3.4. Klinefelter-szindróma

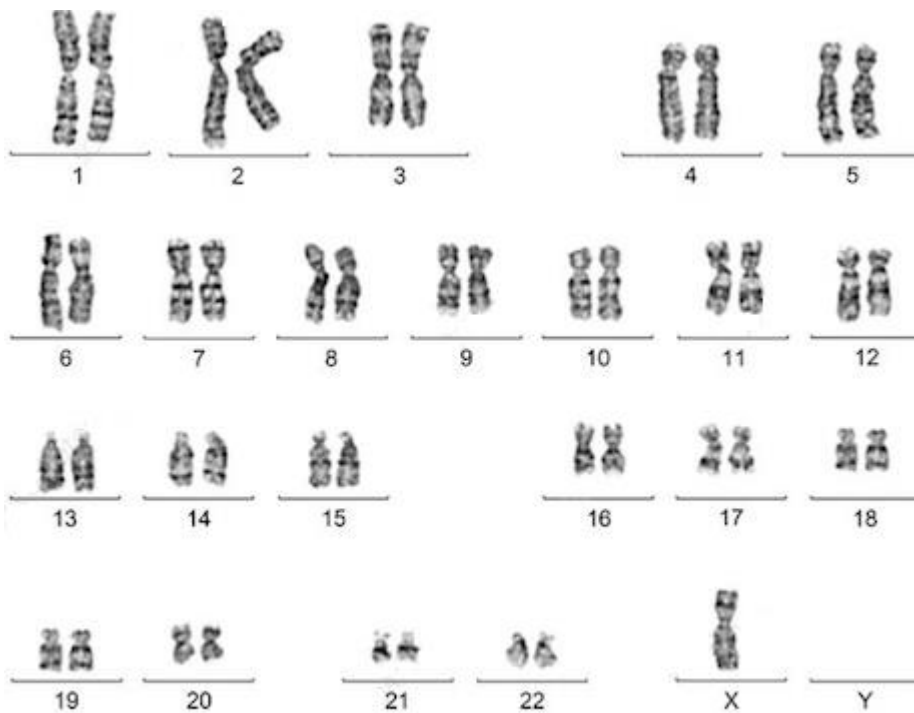
A Klinefelter-szindróma csak férfiakban fordul elő, az X kromoszóma többszörösen van jelen a kromoszómák között. Ez leggyakrabban 47, XXY konstrukcióval jár, az esetek több mint 80 %-ban az inaktivált nemi kromoszóma kondenzációja során keletkező Barr test is megtalálható. Tünetei a sterilitás, a hereatrófia, a herecsatornák hialinizációja és gyakran gynecomastia, melyek pubertáskorban jelennek meg. A mentális retardáció nem feltétlenül komponense a betegségnek, azonban minél több X-kromoszóma van jelen, annál valószínűbb a szellemi visszamaradás bizonyos foka (Crawford, 2017). (7. ábra)



7. ábra. Klinefelter-szindróma karyogramja (saját ábra)

1.3.5. Turner-szindróma

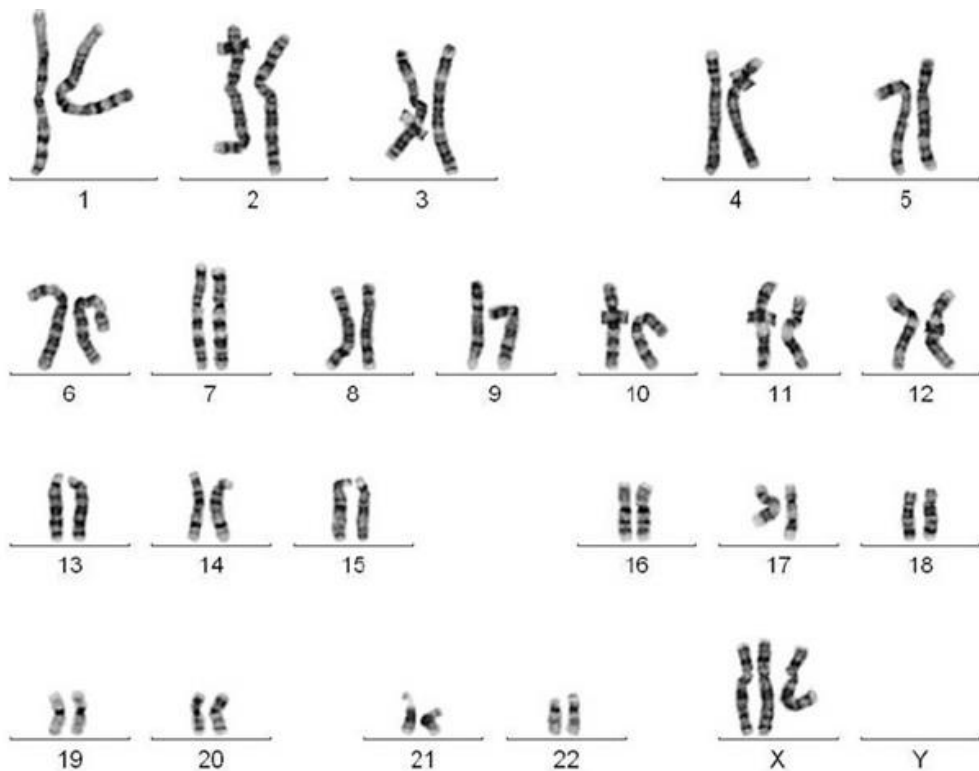
A Turner-szindróma az egyetlen élettel összeegyeztethető monoszómia (a szindrómától szenvedő magzatok 98 %-a azonban így is spontán vetélést áldozata lesz). A kariotípus 45 X, jellemző az ováriumok hiánya. Fenotípusos jellegként alacsony termet, kétoldali nyaki redő, időnként a végtagok lymphoedemája is megfigyelhető. A betegek széles, pajzs alakú mellkassal rendelkeznek, egymástól távol elhelyezkedő emlőbimbókkal (Morgan, 2017). (8. ábra)



8. ábra. Turner-szindróma karyogramja (saját ábra)

1.3.6. Tripla X-szindróma

Az X kromoszóma megháromszorozódása okozta elváltozás az élvészületettek kb 0.1 százalékában fordul elő. A szindrómában szenvedő nőbetegek az átlagosnál magasabbak, azonban jellegzetes fizikai eltérést nem fedezhetünk fel, az érintettek 10 százalékánál figyelhető meg vesebetegség. Gyakrabban fordulnak elő tanulási nehézségek, általában a beszéd és az írott szövegértés terén. A motorikus készségek késleltetett fejlődése, a gyengébb izomtónus, az érzelmi labilitás és viselkedési zavarok szintén sújthatják a szindrómával együtt élőket. Jellemző a cikluszavar, korai menopauza, azonban a szindrómában szenvedők 75 százaléka fogamzóképes (Otter et al, 2010). (9. ábra)



9. ábra. Tripla X-szindróma karyogramja (saját ábra)

1.4. Az aneuploidiák kórétana: a klasszikus eredetmodell és hipotézisek az anyai életkorral való kapcsolatára

Az aneuploidiák kialakulásának elméleti hátterének ismertetését és a leggyakoribb aneuploidiák bemutatását követően már csak egy ismeretlen, azonban annál fontosabb faktor maradt: az elváltozás kórétana, azaz a kérdés: hogyan alakulnak ki az aneuploidiák?

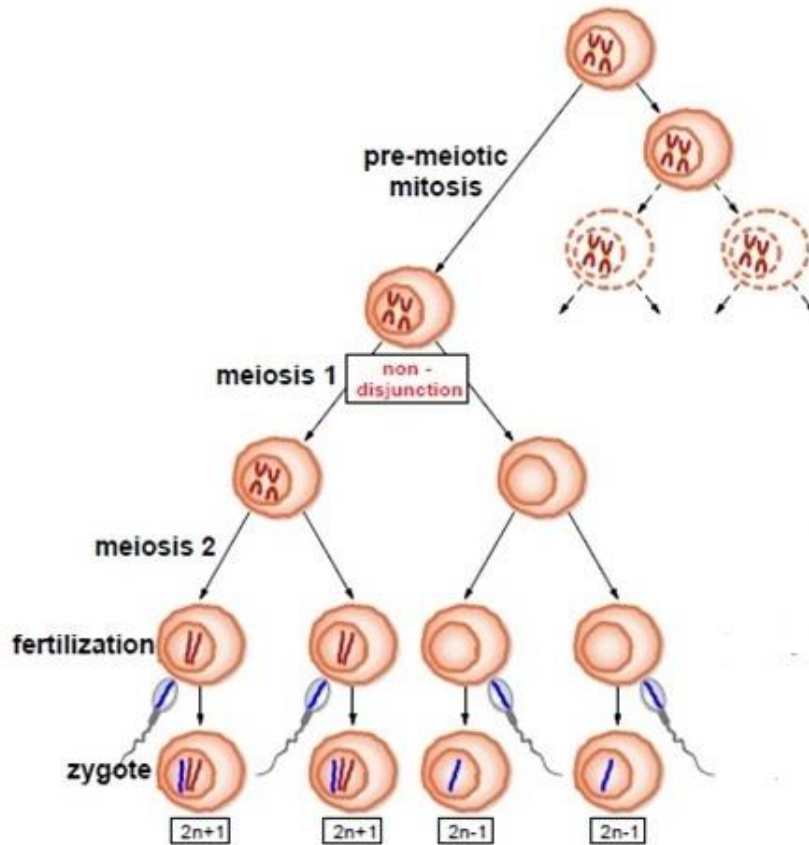
Sajnos egyértelmű, megnyugtató magyarázat erre a mai napig nem született, a rendellenesség intenzív kutatások kereszttüzében áll. Tények, amiket biztosan tudunk: az anyai életkor növekedésével az aneuploidiák száma is arányosan nő. Állatkísérleti modellekkel bizonyították, hogy a kromoszómák eltéréseinek előfordulása idősebb korban bekövetkező megtermékenyülések esetén fokozódik (Ishikawa és mtsai, 1995).

A nőkben a kromoszóma eltérések valószínűsége és ezáltal az aneuploidiák előfordulása az életkorral növekszik, különösen 35 év felett. A Down-szindróma előfordulási esélye 25 éves kor alatti nők esetében 1:2000-hez, azonban az előfordulás az életkorral meredeken emelkedik: 35 éves korban már 1:300- hoz, 40 évesen és efelett 1:100-hoz (Sadler és mtsai 2018).

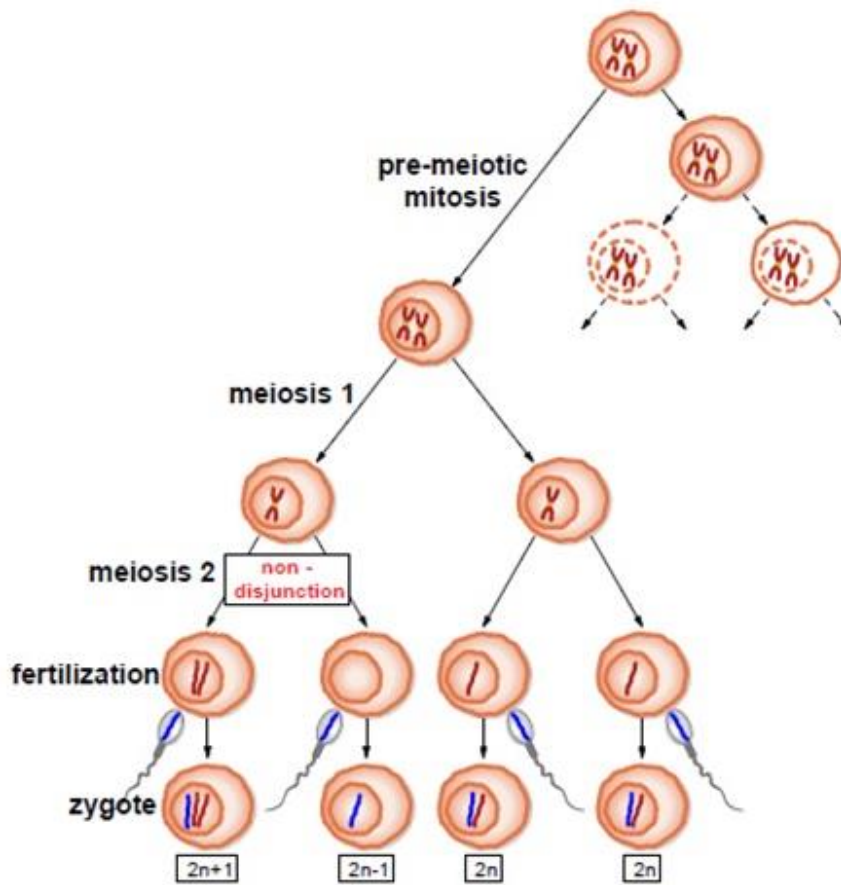
Szintén ismert tény: az aneuploidia mint a kromoszómák számbeli rendellenessége, szükségessé teszi, hogy valamelyik kromoszómából több vagy kevesebb legyen az aneuploid sejtben. Az aneuploidiák hátterében – a meiózis és mitózis ismeretében – minden esetben valamilyen jellegű non-diszjunkció kell, hogy álljon, hiszen a számbeli rendellenességek kialakulása nem jöhet létre a kromoszómapárok megfelelő szétválása mellett. A kromoszómális non-diszjunkció esetén az egyik sejtben 24, míg a másik sejtben 22 kromoszóma lesz, a megtermékenyítés során a hibás genetikai mintázattal rendelkező sejt egyesül egy egészséges, 23 kromoszómát tartalmazó sejtrel, így alakul ki egy 45 (monoszómia) vagy 47 (triszmia) kromoszómát tartalmazó sejt.

Fontos kiemelni, hogy a non-diszjunkció több típusa ismert, hiszen a kromoszómák szétválásának rendellenessége bekövetkezhet a mitózis során, ezen kívül a meiózis I illetve meiózis II során is, ekkor a homológ kromoszómapárok, illetve a testvérkromatidák nem válnak szét. (10. és 11. ábra)

A jelenleg legismertebb elmélet szerint a (21-es) triszómia kialakulásakor meiotikus non-diszjunkció történik egy egyébként diszómias petesejtben. (Ghosh és mtsai, 2009, Allen és mtsai, 2009)



10. ábra. Meiotikus non-diszjunkció: A kromoszómák szétválásának rendellenessége a meiózis I során. (Horányi D, 2019)



11. ábra. Meiotikus non-diszjunkció: a kromoszómák szétválásának rendellenessége a meiózis II során. (Horányi D, 2019)

Azonban mi adja meg a kapcsolatot ezen elmélet és az anyai életkorral összefüggésben tapasztalt tény között? Számos hipotézis látott napvilágot a fentiek megválaszolására, de egyértelmű bizonyítást egyik sem nyert.

A „production line” („produktív folyamat”) hipotézis szerint a magzati élet késői szakaszában a petesejtek fejlődésekor a kevesebb chiasma miatt válnak hajlamosabbá a non-diszjunkcióra, tehát a később keletkezett petesejtek között nagyobb arányban fordul elő aneuploid. A feltételezés szerint a petesejtek olyan sorrendben érnek be a fertilis időszak során amilyen sorrendben alakultak ki a ptefészkekben. Ez azt jelenti, hogy a

korábban kialakult egészséges petesejtek a fiatalabb fertilis korban, míg az aneuploidia potenciált hordozók az anyai fertilis kor későbbi szakaszában alakulnak ki (Henderson és mtsai, 1968). Állatmodellek segítségével azonban nem sikerült minden kétséget kizáróan igazolni ezen elméletet (Tease és mtsai, 1989).

Az „ageing oocyte” („öregedő petesejtek”) modell alapján a születés idejéhez közeledve valamennyi primer oocytá belép a meiózis I profázisába és diplotén állapotú nyugalmi szakaszba kerül, amely akár 40 évig is tarthat. Az elmélet alapján a perzisztáló nukleolusz frekvenciája emelkedhet az idősebb nők esetében, ez vezet az akrocentrális kromoszómák meiotikus szegregációs zavarához, ahol a sejtmagvacska fúziója együtt tartja a rövid karokat (Eichinlaub-Ritter és mtsai, 1998). Egy másik elképzelés szerint a hosszú meiotikus profázis alatt az oocyták sérülékenysége nagyobb és az oszlási orsók károsodását belső és környezeti tényezők egyaránt okozhatják. Ilyenek pl. a nehézfémek ionjai, a sugárzás, vagy az oxidatív stressz is. A szünetelő stádiumban lévő petesejtek sugárérzékenysége magasabb, azonban ez kromoszómánként is változik, pl. a 21 –es és X kromoszóma fogékonyabb a sugárterhelésre, ezáltal a szegregációs zavarra (Tease és mtsai 1991).

A „premature ageing” („korai petefészek kimerülés”) modell szerint a női reprodukív rendszer fiziológiai állapota fontosabb, mint a kronológiai kora – például a fokozott sorvadás miatt bekövetkező petefészekrezerv-csökkenés emelkedett kockázatot eredményez a triszómiákra nézve (Kline és mtsai, 1992). Ebben az összefüggésben 30 éves kor felett a rendelkezésre álló oocyták száma tükrözheti a Down-szindróma kockázatát (Brook és mtsai,1984). Állatkísérleti modelleken ezt sikerült is igazolni: egyoldali petefészek eltávolítás után a másik oldali petefészekben fokozódott az ovuláció, illetve korábban következett be a menopauza, az aneuploidiák kockázata pedig minden korban emelkedett (Faddy és mtsai, 1992).

Más tanulmányok a petefészken végzett műtétek hatását vetik fel: a petefészek térfogatának csökkentésével (petefészek részleges eltávolítása, vagy akár teljes petefészek eltávolítás) a triszómiák gyakorisága egyesek szerint emelkedhet (Freeman és mtsai, 2000).

Humán tanulmányok is alátámasztották a korai menopauza és az aneuploidiák közötti összefüggést: egyikben a Down-szindrómás terhességet követően átlagosan 10,2 évvel később következett be a menopauza, míg a kontrollcsoportban ez átlagosan 12,8 év volt (Freeman és mtsai, 2000).

A menopauza bekövetkezésének ideje triszómiás vetélés után 1 évvel korábban volt, mint normál terhességek esetén (Kline és mtsai, 2000).

A „mikrocirkulációs” hipotézis szerint a non-diszjunkció kóros eltérések sorozata (Gaulden és mtsai, 1992). A hormonális egyensúly zavara, a szuboptimális érezettség a folliculus körül, a csökkent vérátáramlás, az emelkedett szén-dioxid koncentráció és a tüszőn belüli laktátszint, vagy a csökkent pH a nondiszjunkció kockázatát emelő folyamatok lehetnek, melyeket részben állatkísérleti modellekkel sikerült igazolni. (Shimada és mtsai, 1980).

A „késői megtermékenyülés” modell szerint: a petesejtek érésük folyamán a hosszú szünetet követően, tüszőrepedés után a petevezetékbe kerülnek egészen a megtermékenyülésig. A feltételezés szerint a sejtek meiózis II metafázisában töltött hosszabb ideje, ún. „túlérétsége” is fokozhatja a non-diszjunkció előfordulását. Ez a magyarázat az anyai kort és a változó szexuális aktivitást tekinti kiindulónak, az elmélet szerint ugyanis előrehaladott korban a közösülések száma csökken, emellett a teherbeesés lehetősége is csökken, így a petesejtek „túlérhetnek” (German és mtsai, 1968). Epidemiológia kutatások is rámutattak, hogy a megfelelő számú szexuális együttlét mellett a Down-szindróma rizikó csökken (Hook, 1992).

A triszómiák előfordulására számos, környezeti hatásokkal foglalkozó tanulmány is ad magyarázatot, ezek a dohányzást (Yang és mtsai, 1999, Ghosh és mtsai, 2011, Ray és mtsai, 2016), mint káros környezeti tényezőt valószínűsítik a kromoszóma-rendellenességek egyik okaként.

A kromoszóma rendellenességek hátterében az emelkedett anyai életkor terhelő hatása miatt nagyrészt anyai okokat keresünk, azonban a hímivarsejtek lehetséges szerepét is érdemes megvizsgálnunk az aneuploidiák előfordulása esetén. Feltevések szerint a többlet 21-es kromoszómával rendelkező hímivarsejtek akkor fordulnak elő, amikor a 21-es kromoszóma szegregációs zavara/non-diszjunkció következik be a premeiotikus spermatogonális osztódáskor és/vagy, később a meiózis anafázis I. és anafázis II. állapotában. Jelen ismereteink szerint nem lelhető fel herebiopsziák végzéséből releváns információ a kromoszóma szegregációról (Hultén és mtsai, 2010). Minden fertilis korú egészséges férfi spermájában előfordul 1-1 aneuploid sejt: 18-80 éves donorokat bevonásával végzett FISH (fluorescens in situ hybridization) technológiájú spermiumelemzés során az átlagos aneuploidia előfordulása kb. 0,1% volt (Templado és mtsai, 2011).

Fetális here sejtek immunológiai, majd FISH vizsgálata során a megfigyelt minimum 2000 sejt egyikében sem találtak a következő fejezetben részletesen ismertetésre kerülő 21-es triszómiára jellemző mozaikosságot.

Ez a markánsan szignifikáns eredmény azt mutatta, hogy a spermiumoknál 21-es triszómiás mozaikosság nincs, így sokkal kisebb valószínűséggel állhat apai eredet a triszómiák hátterében.

Általánosságban a hímivarsejtek aneuploidiája a férfi infertilitás tényezőivel mutat összefüggést (Vegetti és mtsai, 2000). Az aneuploidia kockázata negatív korrelációt mutat a sperma koncentrációjával, a spermiumok motilitásával morfológiájával és a férfi infertilitás hátterében kb. 2 %-ban ez állhat, míg 5% -ban oligozoospermia, 14%-ban azoospermia (Rodrigo és mtsai, 2004). Egyes elképzelések szerint, a hímivarsejtek aneuploidiáját az előrehaladott apai életkor (Martin és mtsai, 1995) mellett környezeti ártalmak is okozhatják: légszennyezettség (McAuliffe és mtsai, 2012), a dohányzás, az alkoholfogyasztás és a kemoterápia (Robbins, 1997).

1.5. A petesejt mozaicizmus modell leírása és bizonyítása Down-szindróma esetén

Egy 2008-ban megjelent tanulmány során Hultén és munkacsoportja a Down-szindróma kialakulásának egészen eltérő magyarázatára derítettek fényt: véleményük szerint a kórkép háttere a petefészek mozaicizmusban keresendő (Hultén és mtsai, 2008). A rendkívül érdekes és elgondolkodtató elmélet központi alakja a klasszikus értelmezéstől (mely a meiotikus non-diszjunkciót helyezi előtérbe) jelentősen eltérő mitotikus non-diszjunkció.

De mit is takar ez a fajta paradigmaváltás? Ha az előzetesen ismertetett elméleti hátteret áttekintjük, akkor láthatjuk, hogy az aneuploidiáért felelős hiba így már a premeiotikus mitózisban, a primitív csírasejtek nagy mennyiségű számtartó osztódása során létrejön. Ezáltal már egy eleve triszómiás, három darab 21-es kromoszómát tartalmazó petesejt kerül az oogenezis további fázisaiba és a meiózis során csupán „szükségszerű”, ún. szekunder - nondiszjunkciója történik (Cooper, 1948).

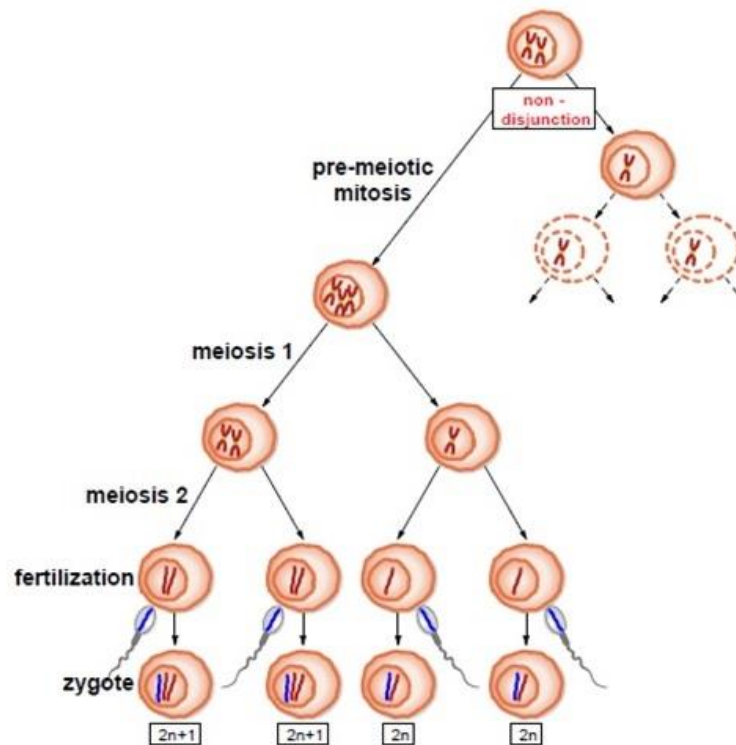
A 21-es triszómia hátterét magyarázó különleges elmélet a petesejt mozaicizmus modell (oocyte mosaicism modell – OMM) nevet kapta. Az OMM alapján a 21-es triszómia tehát egy premeiotikus mitózis során bekövetkező szegregációs hibára vezethető vissza, ezáltal nem az emelkedett anyai életkor indukálja, hiszen a triszómiás petesejtek már magzati korban, a meiózist megelőzően is jelen vannak.

De akkor mi a magyarázata annak, hogy az aneuploidiák előfordulása –különösen 35 év felett- az emelkedett anyai életkorral növekszik? A 21-es triszómiás sejtek, összehasonlítva normális (diszómiás, majd meiózis során monoszómiássá váló) társaikkal, éérésükben lemaradni látszanak (Barlow és mtsai, 2002, Jagiello és mtsai, 1987, Cheng és mtsai, 1998), tehát a diszómiás petesejtek gyorsabban érnek meg és kerülnek ovulációra, ezért a számuk gyorsabban csökken, mint triszómiás társaiké. Ennek eredményeképpen arányaiban több triszómiás petesejt ragadhat a petefészekben az előrehaladott anyai életkorra, mely jelentős kockázatemelkedést a triszómiás terhesség kialakulására (Hultén és mtsai, 2010).

Hogyan lehetett ezt az elméletet bizonyítani? Az elméletet bizonyítani kissé körülményes, azonban nem lehetetlen. Hultén és mtsai 14-22 hetes, fenotípusosan normál leánymagzatok petefészket vizsgálták: post mortem a petefészek eltávolításra kerültek, azokból számos, különféle érési fázisban lévő oocyta, mesenchymalis és primordiális csírasejt vizsgálatára alkalmas preparátumokat készítettek. A preparátumokat több napos

immunhisztokémiai vizsgálatnak vetették alá, ennek során a meiozisba lépett és még e fázis előtt álló sejtek megkülönböztetése egy meiózis specifikus fehérje segítségével (stromal antigen 3, STAG3) zajlott. Az egymástól elválasztott sejteket ezt követően FISH vizsgálatnak vetették alá, ahol minden esetben találtak a diszómias petesejtek mellett triszómias petesejteket és primordiális csírasejteket is (Hultén és mtsai, 2008). A diszómias sejtek mellett átlagosan a sejtek 0,54%-a 21-es triszómias volt (0,20-0,88%) a teljes sejtpopulációban, tehát a premeiotikus és mesenchimális sejtekben is.

A klasszikus eredetmodell alapján a meiotikus non-diszjunkció okozza a triszómiák előfordulását, míg a petesejt mozaicizmus modell alapján egy premeiotikus, mitotikus non-diszjunkció miatt bekövetkező szegregációs hiba áll a folyamat hátterében. (12. ábra)



12. ábra. Pre-meiotikus mitózis során bekövetkező non-diszjunkció.

A non-diszjunkció a meiosist megelőző mitózis során létrejövő szegregációs hiba miatt alakul ki. (Horányi D, 2019)

Ebből arra következtethetünk, hogy már az egyedfejlődés kezdeti szakaszában is megjelenik bizonyos fokú aneuploidia a petesejtek között, ez a környezeti tényezőktől és egyéb hatásoktól független, különbség csak a triszómiás és diszómiás sejtek fogyási ütemében van.

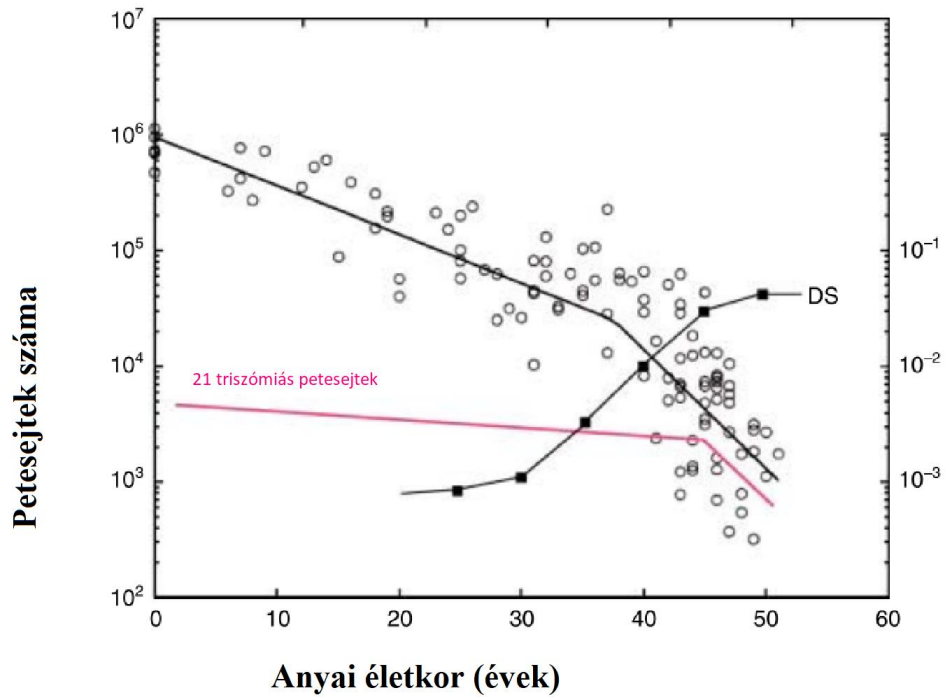
Mit jelenthet ez a gyakorlatban? Minden olyan hatás, ami az ovulációt és ezáltal a petesejtek számának idő előtti csökkenését gátolja, hasznos lehet a triszómiák előfordulásának csökkentésében. Az elmélet eddig a 21-es triszómia esetén került bizonyításra, azonban rendkívüli jelentősége miatt fontosnak tartottuk megvizsgálni az esetleges létjogosultságát más, egyéb gyakori triszómia esetén is, ezt a célkitűzés során szeretném ismertetni.

Hultén és mtsai feltételezésének nyomán tehát a 21-es triszómiás petesejtek a normál petefészekszövetben már eleve jelen vannak egy kromoszómális mozaicizmus részeként, mely nem eseti eltérés, hanem fontos biológiai jelenség, a genetikai sokszínűség, a prenatális fejlődés része. Ennek szerepe lehet a posztnatális élet folyamán megfigyelt betegségek kialakulásában vagy akár az öregedésben is (Iourov és mtsai, 2008).

Évek alatt számos feltételezés látott napvilágot a 21-es triszómia és az anyai életkor összefüggésében, a hiba fő forrásaként megjelölve egy normál diszómiás sejt meiózisban bekövetkező szegregációs hibáját (Hunt és mtsai, 2008, Jones és mtsai, 2008, Allen és mtsai, 2009, Ghosh és mtsai, 2009).

Hultén és mtsai szerint viszont a 21-es triszómia eredete a 21-es kromoszóma premeiotikus szegregációs hibájára vezethető vissza. Lehetséges, hogy a 21-es triszómiás (T21) petesejtek megmenekülnek az apoptózistól, ezáltal fennmaradnak és akkumulálódnak a petefészekben (Hultén és mtsai, 2008). (13. ábra). A magzati élet negyedik hetében az endodermális sejtekből kialakuló primordiális sejtek vándorlása során a premeiotikus petesejtek mitotikus osztódása révén alakul ki hozzávetőlegesen hétmillió petesejt a 20. terhességi hétre. A meiózis profázisa a 9. héten kezdődik meg, majd évekre leáll. Feltételezhető tehát, hogy a normál kromoszómák szegregációs hibája egy nagyon korai mitózissal vezethető vissza.

A petesejt mozaicizmus modell kétrétű: egyfelől egy az első meiotikus osztódásban bekövetkező szekunder nondiszjunkció (Cooper, 1948), másfelől az előrehaladott anyai életkorra a triszómiás/diszómiás sejtarány romlása (ennek hátterében a diszómiás sejtek, triszómiás társaikhoz hasonlított gyorsabb fogyása) állhat.



13. ábra. Példa a 21-es triszómiás sejtek akkumulációjára a petefészekben.

Az anyai életkor előrehaladtával a diszómiás petesejtek gyorsabban fogynak el, mint triszómiás társaik, ezáltal a triszómiás/diszómiás petesejtek aránya romlik.

(DS: Down-szindróma, a jelöletlen görbe a normál kromoszómakészletű petesejteket, a rózsaszín görbe a 21-es triszómiás petesejteket jelöli)

(Barlow, 2002)

2. Célkitűzések

A bevezetés során ismertetett petefészek mozaicizmus modell alapján a 21-es triszómia egy premeiotikus mitózis során bekövetkező szegregációs hibára vezethető vissza. Ez az elmélet azonban kutatásunk megkezdésekor még csak a Down-szindróma hátterében álló aneuploidia esetében volt bizonyított.

Az elmélet jelentősége kiemelkedő, hiszen a tudományos paradigmaváltáson kívül az ovulációs rezerv megőrzésével a triszómiák előfordulási számának csökkenését is vizionálhatjuk, amelynek jelentős klinikai jelentőséget tulajdonítottam.

Kutatásunk során a legfőbb kérdésünk a következő volt: van-e az elméletnek létjogosultsága egyéb aneuploidiák esetén is? Az elméletet alkalmazhatóságát egy másik gyakori előfordulású triszómia esetében tartottam célszerűnek megvizsgálni: választásom a Patau-szindrómát okozó 13-as triszómiára esett.

Miért választottam a 13-as triszómiát?

1. A Patau-szindróma egy olyan klinikailag súlyos állapot, mely a felismert terhességek 0.18 %-ban detektálható, 1:5000 élveszületési aránnyal. A betegség súlyos mentális és szomatikus eltérésekért felelős, a rendellenességgel súlytolt betegek 85 %-a nem éri meg az egy éves életkort, ezáltal klinikai jelentősége kiemelkedő.
2. Bár nem a leggyakrabban előforduló triszómia, hiszen például a 16-os és 22-es triszómia sokkal gyakrabban jelentkezik, nem okoz spontán magzati elhalást igen korai terhességi korban, ezáltal sokkal jobban vizsgálható.
3. Egyéb vizsgálati módszerekkel, mint például ultrahang diagnosztikával, megléte vagy hiánya jól valószínűsíthető.

A megfelelő kromoszóma kiválasztását követően Hultén és munkatársai által megfogalmazott irányelvek alapján kezdtem meg a kutatómunkát.

Kutatómunkánk során célkitűzéseim a következők voltak:

1. Magzati petefészkek gyűjtése a kutatásom szempontjából legmegfelelőbb, 16-23 hetes magzati korból származó, nem genetikai ok miatt történt spontán, vagy nem genetikai indokkal történt középidoős vetelésindukción átesett leánymagzatoktól. A sikeresen begyűjtött minták segítségével a magzati petesejteket terveztük tanulmányozni.
2. A sikeresen begyűjtött mintákból a meiózis kezdeti szakaszát már megkezdő és a meiózisba még nem lépett, következtetésképpen praemeiotikus mitózisban lévő petesejtek egymástól történő szétválasztását szeretnénk volna kivitelezni.
3. A sikeresen különválasztott praemeiotikus őssejtekben és meiózist megkezdett ivarsejtekben az általunk fent részletezett indokok miatt kiválasztott 13-as kromoszóma jelenlétét szeretnénk volna bizonyítani. A kromoszóma jelenlétének bizonyítását, majd a 13-as triszómiás sejtek kiválasztását követően, végül célunk azok pontos arányának meghatározása volt mindkét sejtcsoportban.
4. A fent részletezett célkitűzések sikeres teljesítését követően végső célunk az ovárium mozaicizmus modell létjogosultságának bizonyítása volt az eddig bizonyított 21-es triszómián kívül a 13-as triszómia esetén is.

3. Módszerek

Kutatásom labormunkálatait 2013. január és 2015. október között végeztem a Semmelweis Egyetem I. sz. Szülészeti és Nőgyógyászati Klinikájának és a Semmelweis Egyetem I. sz. Patológiai és Kísérletes Rákkutató Intézetének együttműködésével.

3.1. A magzati petefészkek vizsgálata

Első számú célkitűzésemnek megfelelően kezdeti lépésem a mintagyűjtés és a minták feldolgozása volt a magzati petesejtek tanulmányozása érdekében. A mintagyűjtés során céлом olyan lánymagzatok petefészkének begyűjtése volt, ahol a petesejtek már kellő számban vannak jelen, ezáltal megfelelően analizálhatók. Erre a célra a második trimeszter második fele tűnt a legalkalmasabbnak: habár a petefészkek a terhesség 12. hete után már egyértelműen felismerhetővé válnak, azonban a vizsgálható csírasejtek száma ekkor még nagyon alacsony, számuk a második trimeszter második felében (pontosítva a 20-25. hét környékén) éri el a maximális, 7-10 milliós számot.

A mintagyűjtést nehezítette, hogy a középidős vetélések, vetelésindukciók száma jelentősen kevesebb, mint az első trimeszterbeli magzati veszteségeké és még ez az alacsony esetszám is redukálódott az esetleges fiúmagzatok szükségszerű kizárásával. Ezen kívül kutatásom jellegéből adódott, hogy minden olyan vetélést, melynek háttérben genetikai indok szerepelt, szükséges volt kizárnunk.

A rendelkezésemre álló idő alatt hét, 16-23 hét közötti leánymagzat ováriumait tudtuk összegyűjteni és feldolgozni. A minták begyűjtése és feldolgozása a betegek szükséges tájékoztatást követő beleegyezésével és az Etikai Bizottság jóváhagyásával történt (4419/2013/EKU). Kontroll minták céljából két normál karyotipusú személy vérvételét követően azok lymphocytá mintáját alkalmaztuk.

A minták elsődleges feldolgozását a Semmelweis Egyetem I. Sz, Szülészeti és Nőgyógyászati Klinikájának Fethopathológiai laboratóriumában végeztük. Ennek során a petefészkeket a vetélést követően pár órán belül eltávolítottuk, majd ún. „touch preparátumokat” készítettünk belőlük: ennek során az apró magzati ovariumra rámetsettünk, majd a felszínét vékonyan egy üveglapra nyomtuk, ennek során a sejteknek egy olyan vékony rétege jött létre, mely további immunreakció végzésére és

analízisre is alkalmas volt. Egy petefészekből a lehető legtöbb metszetet és touch preparátumot próbáltunk kinyerni, a petefészek mérete a lehetőségeink számát limitálta (bizonyos ováriumok esetén 4 darab, míg mások esetén csupán 1 darab tárgylemez készülhetett). A minták ezt követően sorszámot kaptak.

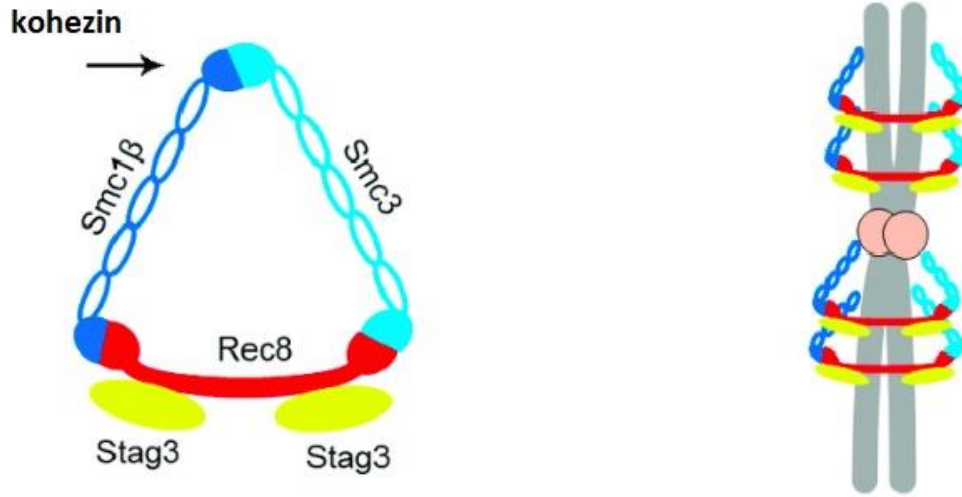
A mintákat a további vizsgálatok elvégzéséhez át kellett szállítanom az I. sz. Patológiai Intézet Cytogenetikai Laboratóriumába, a szállítás és a tárolás +4°C-on történt.

3.2. Premeiotikus mitotikus és meiózisban lévő sejtek elkülönítése

A második számú célkitűzésünknek megfelelően a labormunka ezt követő fázisában az előkészített petefészek mintákban a meiózist már megkezdett ivarsejteket akartam elkülöníteni a mitózis állapotában lévő, másnéven praemeiotikus őssejtektől és stromasejtektől. Erre az anti-STAG3 antitesttel történő immunreakció tűnt a legalkalmasabbnak.

A STAG3 fehérje (stromal antigén 3 fehérje) a testvérkromatid kohéziót biztosító kohezin komplex REC-8 alegységének egyetlen meiózis specifikus tagja, szerepe a testvérkromatidák együttmaradásának biztosítása az anafázis kezdetéig, ezáltal a STAG3 antitest pozitív sejtek bizonyíthatóan meiosisban vannak (Fukada et al., 2014). (14. ábra)

A testvérkromatid kohéziót biztosító kohezin komplex



14. ábra: A kohezin komplex. A testvérkromatidák együttmaradásának biztosítását az anafázisig a kohezin komplex végzi. A komplex REC-8 alegységének egyetlen meiózis specifikus tagja a STAG3 fehérje (saját ábra). STAG3: stromal antigén3 fehérje, SMC1: *Saccharomyces cerevisiae* 1, SMC3: *Saccharomyces cerevisiae* 1, REC8: recombination protein 8

Vizsgálataink során a Sigma-Aldrich cégcsoport nyúlban megtermelt, vizes glicerolos oldatban forgalomba hozott termékét használtam (Sigma Aldrich Anti-STAG3 antibody produced in rabbit, Human Protein Atlas Number: HPA049106). Labormunkálataim legkörülményesebb része a pontos antitest titer beállítása volt, hiszen az általam templátként alkalmazott Hultén és mtsai által leírt immunhisztokémiai modell pontos arányokat nem tartalmazott. A megrendelt antitesten ajánlott koncentráció az 1:200-1:500 titerű hígítást javasolta, azonban ennek során a minták nem festődtek kellő intenzitással, a titer csökkentése, ezáltal az antitest koncentráció növelése pedig a háttér jelintenzitásának növekedését, a reakció zavarossá válását eredményezte. (15. ábra) A hónapokon át történő antitest titer beállítás során az immunreakciót megelőző

előkezelést is módosítottuk, így tudtuk elérni a kellő jelintenzitás mellett a megfelelően kontrasztos hátteret.

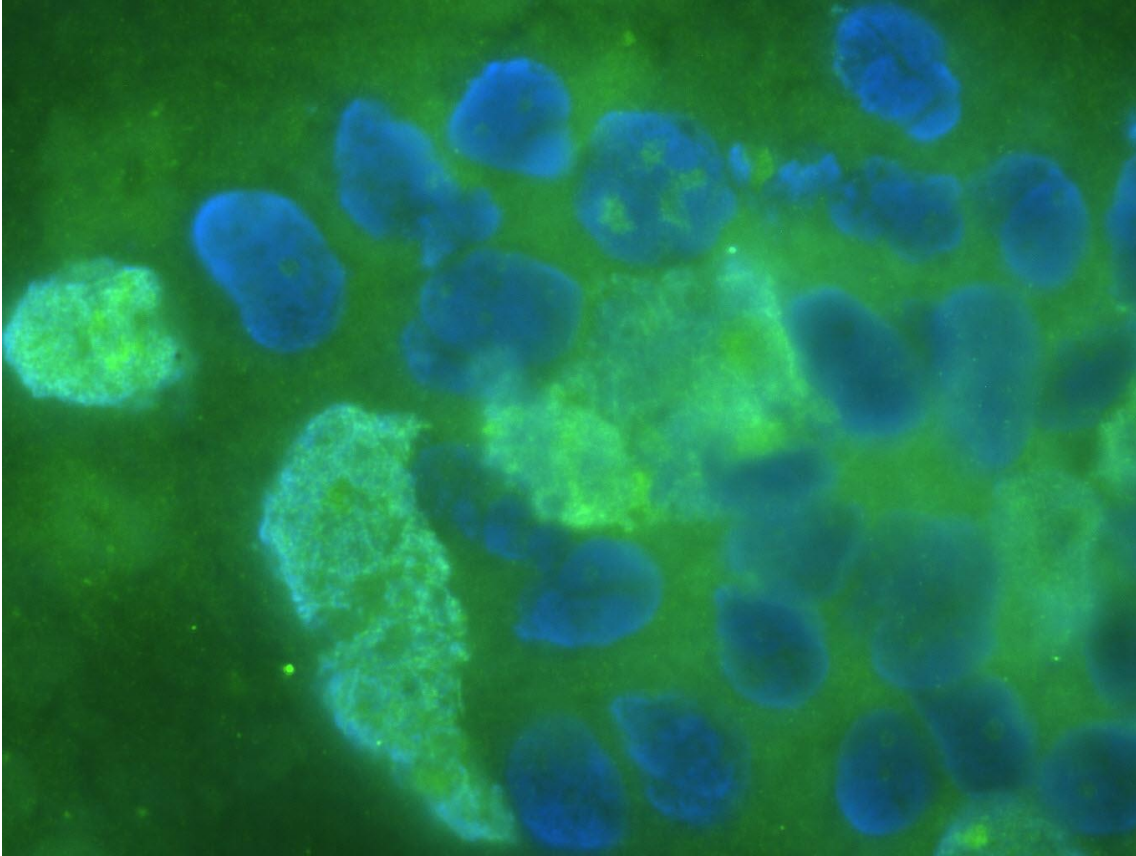
A kialakított immunhisztokémiai előkezelés a következőképpen zajlott: Kezdeti lépésként a tárgylemezen lévő fehérjéket formalinnal fixáltuk (10 %-os neutrálisan bufferelt oldat a Sigma-Aldrich cégcsoporttól) egy 10 perces szobahőmérsékleten történő áztatással. Ezt követően 5 percig szobahőmérsékleten sodium citrát dihidrát segítségével történő áztatás következett a nem kívánatos szennyeződések eltávolítására. A kezdeti lépéseket követően háromszor 15 perces PBS (phosphate buffered saline) neutrális mosóoldattal történő tisztítás következett.

A tárgylemezeket 45 perces bovine sérum albumin 5 %-os PBS oldatában fixáltuk 45 perc alatt sötétkamrában +4°C-on. A megtisztított és előkezelt tárgylemezen ekkor megkezdődhetett a tényleges immunreakció első lépese: ennek során a már említett anti-STAG3 antitest 1 %-os, bovin szérum albumin/PBS oldatban történő hígítását a tárgylemezre felvittük, parafinos fedést biztosítottunk a kiszáradás elkerülésére és 12 órán keresztül sötétkamrában inkubáltuk. Az inkubációt követő háromszor 15 perces tisztítás után felvittük a másodlagos antitestet 2.5/400 ml bovin szérum albumin/PBS oldatban történő hígítási koncentrációban.

Végző lépésként a szükséges háromszor 15 perces PBS mosást követően Vectashield, DAPI-t (4'6-diamidino-2-phenylindole) tartalmazó, a fluoreszcencia megőrzésére szolgáló oldatot hordtunk fel a metszlapunk felszínére.

Ezen lépések segítségével megvalósult a magzati ovariumból vett minták meiózis alapon történő minőségi elkülönítése: a STAG3 negatív sejtek homogén kék színnel, míg a STAG3 pozitív sejtek, kissé hálózatos, erős világoszöld színben tűntek fel.

A kontroll mintákon alkalmazott fent ismertett immunhisztokémiai módszerrel STAG3 pozitív sejteket nem nyertünk.



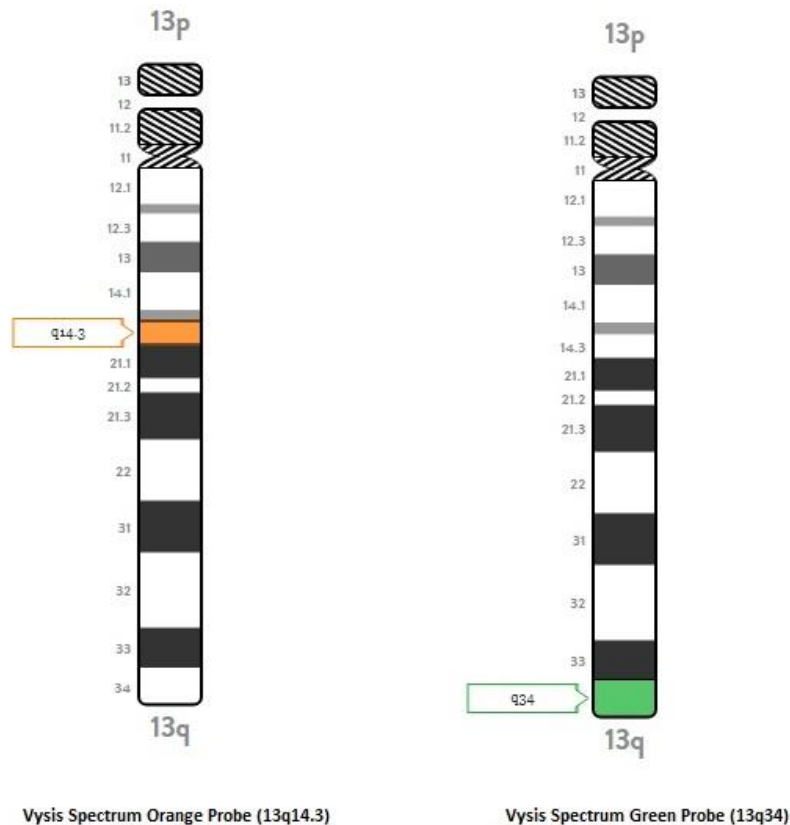
15. ábra. Az immunreakció nehézségei: példa nem kielégítő minőségű immunreakcióra. A háttér jelintenzitásának növekedése a pontos sejthatárok elmosódását eredményezte (saját ábra).

3.3. A 13-as triszómiás sejtek arányának meghatározása

Az immunhisztokémiai módszerekkel történő sejtcsoport elkülönítést követően rátérhettem kutatómunkám harmadik célkitűzésének megvalósítására: a 13-as kromoszóma megjelenítésére és számszerűsítésére, ennek sikeres elvégzését követően pedig a 13-as triszómiás sejtek megszámlálására és azok pontos arányának megállapítására a STAG3 pozitív és STAG3 negatív sejtek esetén.

A kromoszómák megjelenítését és számszerűsítését FISH reakcióval végeztük (fluorescens in situ hibridisation). A FISH reakció során a DNS fragmentumokat fluoreszkáló festékkel jelölünk meg, így fénymikroszkóppal nem látható kromoszóma részleteket is azonosíthatunk. A módszer érzékenysége kimagasló, akár 100 bázis méret alatti szekvenciák is kimutathatóak, egyszerre több DNS szekvencia analízise mellett.

Az I. Sz. Patológiai Intézet FISH laboratóriumának nagy gyakorlatával, jártasságával a szükséges FISH reakció kidolgozása nehézségek nélkül a következőképpen történt: Az immunhisztokémiai módszerrel előzetesen előkezelt mintákat methanol ecetsavval fixáltuk. A fixált mintákat kétszer standard citrátos sóoldattal öblítettük, majd a nem kívánatos, FISH reakciót torzító fluoreszcens anyagokkal bevont proteineket pepszinnel emésztettük. A 13-as kromoszóma hibridizációjához egy kromoszóma-végi próbát (Vysis LSI (13q14) Spectrum Green) és egy centroméra-közeli próbát (Vysis LSI (13q34) Spectrum Orange) alkalmaztunk a gyártó által javasolt módon. A FISH reakció végén a lemezeket Vectashield, DAPI-t (4'-diamidino-2-phenylindole) tartalmazó oldattal fixáltuk. (16. ábra)



16. ábra. FISH reakció során hibridizációhoz használt reagensek kapcsolódási helye és fluoreszcens színe. Egy kromoszóma-végi próbát (Vysis LSI (13q14) Spectrum Green) és egy centroméra-közeli próbát (Vysis LSI (13q34) Spectrum Orange) alkalmaztunk: ezáltal biztosítottuk a 13-as kromoszóma pontos analizisét, sérülése esetén a fals triploidia detektálását. (ábra forrása: www.vysis.com)

A tárgylemezeken megjelenő fluoreszcens szignálok az Intézetben rendelkezésre álló Nikon Eclipse E600 fluoreszcens feltéttel rendelkező fénymikroszkóppal váltak szabad szemmel is felismerhetővé, a fotódokumentációt a mikroszkóphoz csatlakoztatható Jenoptik CCD fényképezőgép segítségével végeztük.

A FISH reakció során a diszómias sejtek két darab zöld és két darab narancsos - pirosas szignállal, a monoszómias sejtek egy zöld és egy narancsos-pirosas szignállal, míg a triszómias sejtek három zöld és három-narancsos pirosas szignállal rendelkeztek.

A megfelelő próbákkal (centroméra közeli és kromoszómavég közeli) próbáltuk az analízist megkönnyíteni a szignálok összeolvadásának kisebb valószínűsége érdekében, azonban a kromoszómasérülések okozta törésre, és egyenlőtlen szignálsokszorozódásra így is kiemelt figyelmet kellett fordítsunk.

A kontroll mintákon alkalmazott FISH reakció 13-as triszómiát nem mutatott.

Honnan tudjuk, hogy a vizsgált STAG3 pozitív vagy STAG3 negatív sejtek hány darabot tartalmaznak a vizsgálatunk keresztüzében álló 13-as kromoszómából?

Mivel a STAG3 pozitív és negatív sejtek második célkitűzési pontunknak megfelelően minőségi, és a 13-as kromoszóma számát célzó harmadik célkitűzési pontunknak megfelelően mennyiségi analízis is fluoreszcens antitestek segítségével valósult meg, így az előzetesen immunreakcióval kezelt sejtek ellenőrzését és fényképezését követően a fáradtságos munkával elért immunfluoreszcenciát a tárgylemezeiről szükséges eltávolítsuk, hogy az a FISH reakció során ne okozzon zavart az egymásra vetülő fluoreszcens jelek megtévesztő hatása által.

A sikerrel elvégzett FISH reakció után azonban a sejtek homogén kék színűek lettek és csak a kromoszómák megszámlálását lehetővé tevő zöld és narancsos-pirosas szignálok világítanak, tehát eltűnnek a STAG3 pozitív és negatív sejtek között fellelhető színbeli különbségek.

Ahhoz, hogy ellenőrizhessük mindkét reakció eredményét és a harmadik célkitűzési pontnak megfelelően a STAG3 pozitív és STAG3 negatív sejtekben előforduló 13-as triszómias kromoszómák arányát megállapíthassuk, ahhoz az előzetesen elektronmikroszkóp segítségével megvizsgált és lefényképezett tárgylemezek párhuzamos analízisét kellett, hogy elvégezzük. Ebben volt segítségünkre a 3D Hystec CaseViewer programja. A program lehetővé teszi a megfelelő felbontású monitor mellett a párhuzamosan bescannelt lemezek egyidejű, párosított elemzését, ezáltal egyszerre két

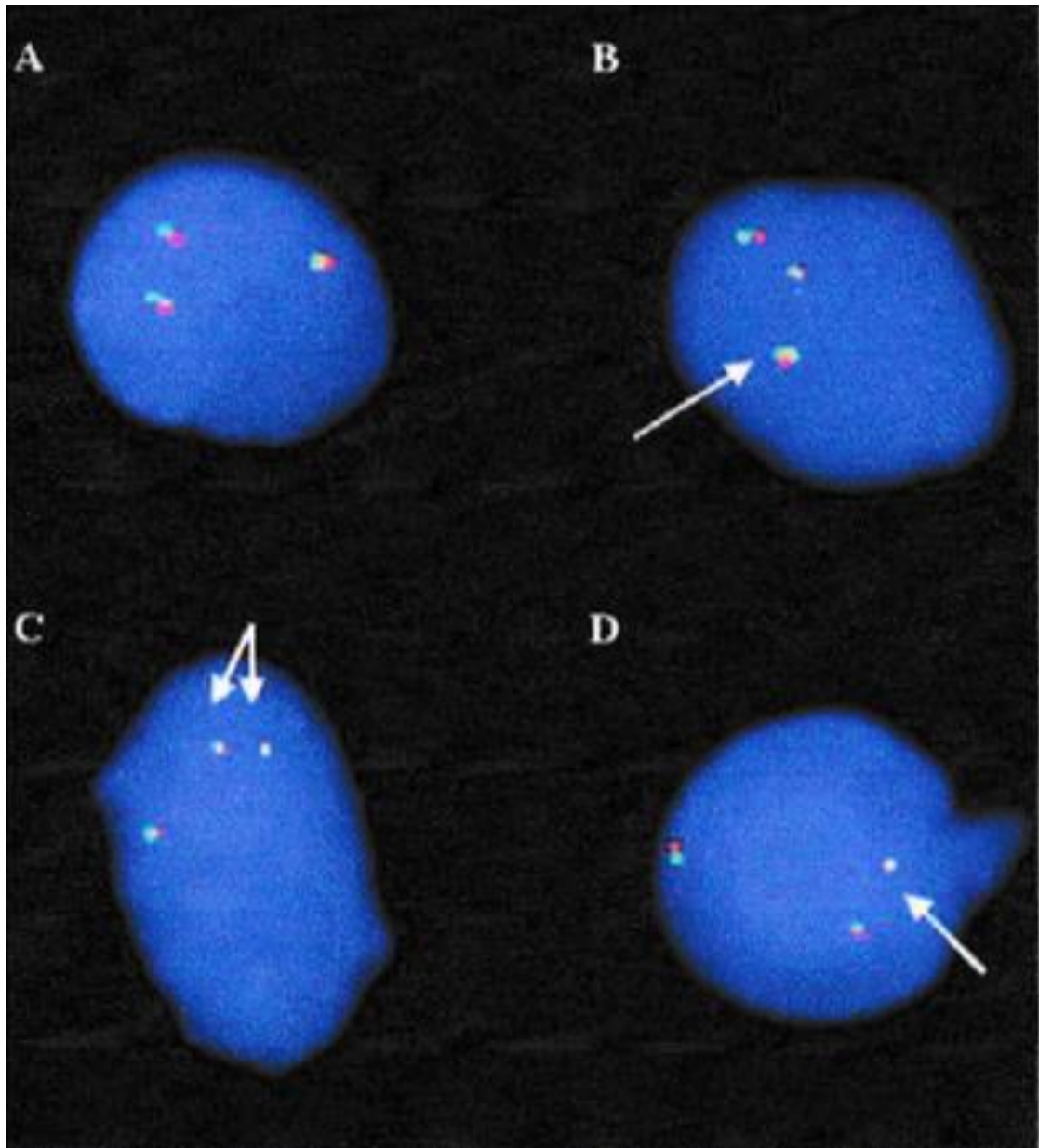
lemez is feldolgozható. A program segítségével a kis nagyítású tájékozási nézettől egészen a kromoszómák analizésére alkalmas 10 mikrométeres nagy nagyítású nézetig van lehetőség.

Az összepárosított lemezekon átlagosan ezer STAG3 pozitív és STAG3 negatív sejt szemmel történő ellenőrzését és megszámlálását végeztem, szigorú kritériumrendszer alapján, ezáltal kizárásra került minden olyan sejt, ahol az immunreakció nem egyértelmű, esetleg homályos, vagy a kromoszómák száma nem felelt meg a követelményeknek (pl. három darab zöld, azonban két darab narancsos-pirosas szignál a kromoszóma sérülését, nem pedig valódi triszómiát feltételez). (17. ábra)

A negyedik célkitűzés az ovárium mozaicizmus modell létjogosultságának bizonyítása volt a 13-as triszómia esetén. Ennek módszere a STAG3 negatív 13-as triszómiás sejtek jelenlétének bizonyítása volt a vizsgált mintáinkban.

Statisztikai analízissel bizonyítottuk be, hogy a kontroll mintákban észlelt 13-as triszómiás sejtekhez képest szignifikánsan nagyobb számban fordul elő a vizsgált ovariumokban 13-as triszómia.

A folyamatos változók összehasonlításához Spearman korrelációt alkalmaztunk, a statisztikai szignifikancia szintjét $P=0.05$ értéként definiáltuk. (18. ábra)



17. ábra. A FISH reakció értékelésének nehézségei. A. Jól észelhető triszómia. A sejtekben 3-3 éles szignál látható. B. Két szignál összeolvadása (zöldes) eredményez triszómiának imponáló képet. C. 3 látható zöld szignál mellett csupán 1 éles piros szignál. D. 2 piros és 2 zöld szignál mellett szignálként megjelenő műtermék látható. (Hultén et al, 2010)



18. ábra. Folyamatábra a kutatásom során alkalmazott módszerekről.

(FISH: fluoreszcens in situ hibridizáció, anti-STAG3: stromal antigen 3, töltés-csatolt eszköz (charge coupled device)), saját ábra.

4. Eredmények

4.1. Magzati petefészkek vizsgálata

Kutatásom első számú célkitűzése olyan lánymagzatok petefészkeinek begyűjtése volt, ahol a petesejtek már kellő számban vannak jelen, ezáltal megfelelően vizsgálhatók a továbbiakban. A mintagyűjtés során rendelkezésre álló idő alatt hét, 16-23 hét közötti leánymagzat ováriumait dolgoztuk fel sikeresen. (1. táblázat) A minták begyűjtése és feldolgozása a betegek szükséges tájékoztatást követő beleegyezésével és az Etikai Bizottság jóváhagyásával történt (4419/2013/EKU).

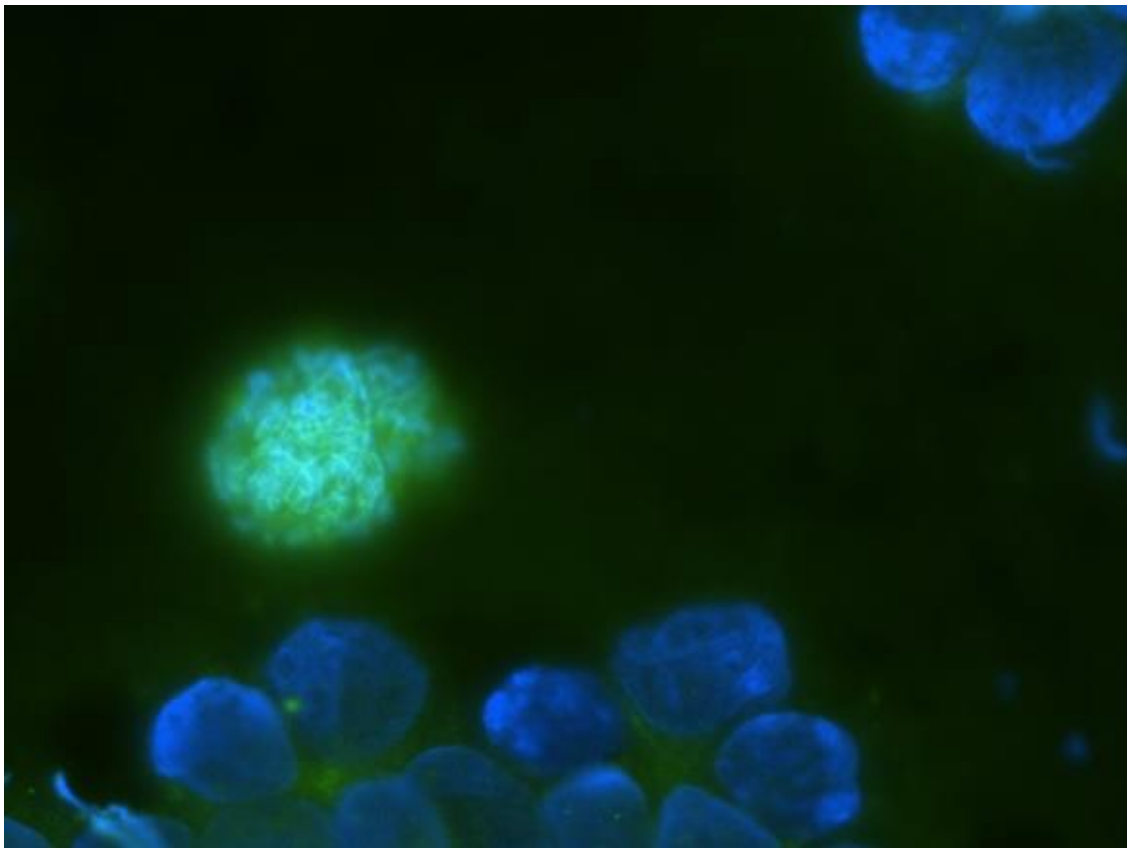
1. táblázat. A vizsgált tárgylemezek.

16-23 hetes leánymagzatok petefészket dolgoztuk fel, táblázatomban látható a lemezek pontos feldolgozási dátuma, a gestációs hét és a sikeresen elkészített tárgylemezek száma is. A minták mennyiségéből és az eltelt időből látható, hogy a minták fellelése és a sikeres előkészítés rendkívül időigényes része volt kutatásomnak.

Tárgylemez száma	Gesztációs hét	Kapott tárgylemez (db)	Touch preparation technika időpontja
137/14	21	2	2014. 09.
72/14	16	1	2014.09.
142/14	18	2	2014.10.
161/14	19	2	2014.11.
13/15	20	2	2015.03.
27/15	23	4	2015.03.
53/15	23	2	2015.04.

4.2. A STAG3 pozitív és STAG3 negatív sejtek elválasztása

Vizsgálataim során a második célkitűzésem szerint a sikeresen feldolgozott ovariumokban a már meiózist megkezdett ivarsejteket volt céloom elválasztani a mitózis állapotában lévő, másnéven praemeiotikus őssejtektől és stromasejtektől. Labormunkálataim rendkívül időigényes része volt az anti-STAG3 antitest alkalmazási koncentrációjának beállítása, azonban a megfelelő antitest titer elérését követően a célkitűzést teljesítettem. (19. ábra)

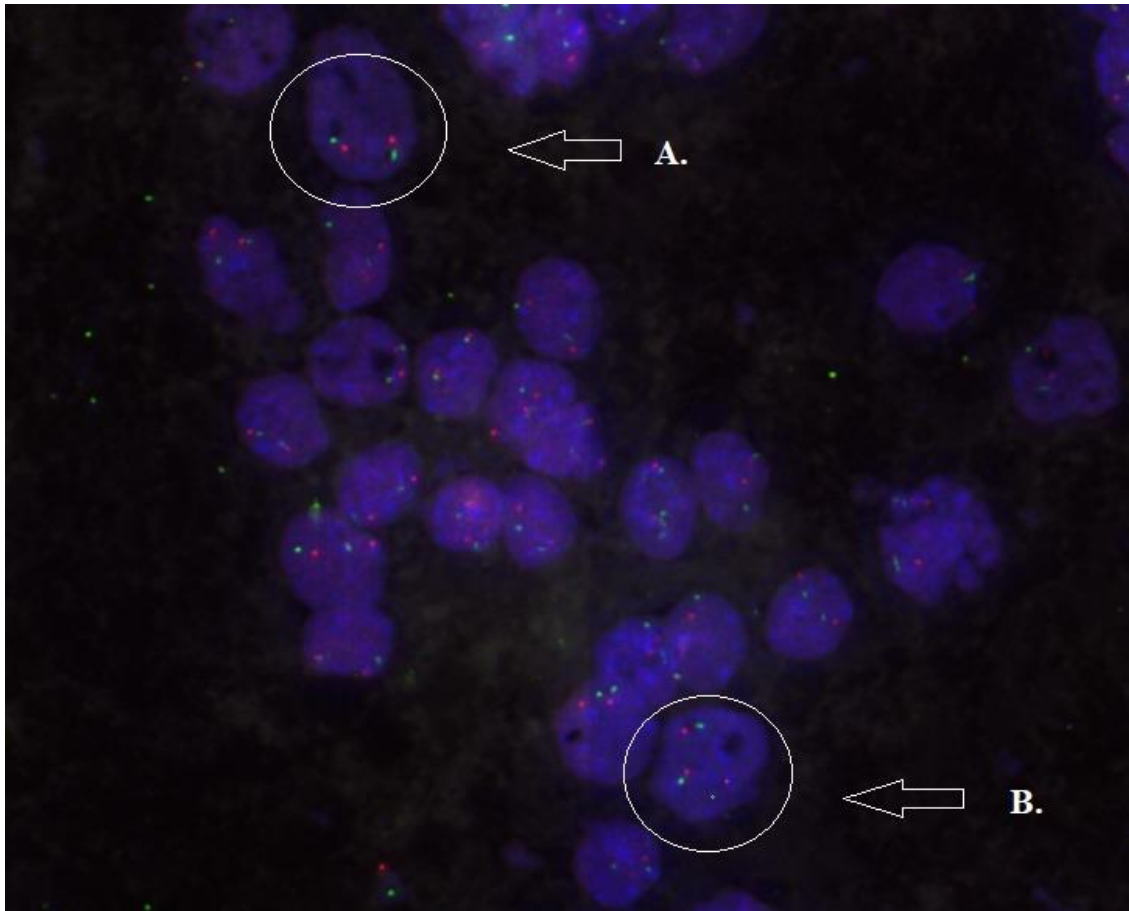


19. ábra. Példa STAG3 pozitív és STAG3 negatív sejtekre, kielégítő minőségű immunreakció során. A STAG3 negatív sejtek homogén kék színnel, míg a STAG3 pozitív sejtek, kissé hálózatos, erős világoszöld színben tűntek fel, míg a háttér sötét, lehetővé teszi a pontos sejthatárok felismerését. (saját ábra)

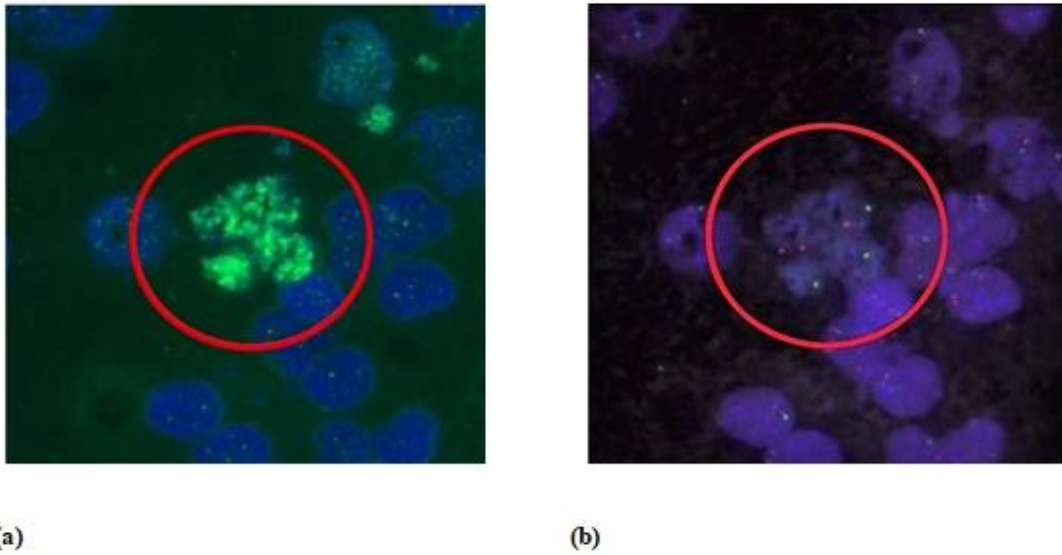
4.3. A 13-as triszómiás sejtek arányának megállapítása

A harmadik célkitűzésnek megfelelően az ezt követő lépés a praemeiotikus őssejtekben és meiózist megkezdett ivarsejtekben a 13-as triszómia jelenlétének bizonyítása, azok pontos arányának meghatározása volt a STAG3 pozitív és STAG3 negatív sejtcsoportban. Az alkalmazott FISH reakció során a kívánt DNS fragmentumok megfestésével láthatóvá tettem a 13-as kromoszómát mindkét sejtcsoportban. Az adatok vizsgálatához az immunreakción és a FISH reakción átesett lemezeket a Case Viewer program segítségével párosítottam, majd szakorvosi és szakdolgozói ellenőrzés mellett a STAG3 pozitív és STAG3 negatív sejteket szem ellenőrzése mellett vizsgáltam. Célunk minden tárgylemezen legalább ezer darab STAG3 pozitív és ezer darab STAG3 negatív sejt megszámolása, a megszámolt sejtekben a 13-as kromoszómára vonatkozó kromoszómaszám megállapítása volt, előzetesen felállított kritériumrendszer alapján (csak a 3 narancsos pirosas és 3 zöld szignállal egyértelműen sejthatárokon belül rendelkező sejteket fogadtam el triszómiásnak). (20. és 21. ábra) Célunkat a vizsgált hét darab tárgylemezből 6 darabnál sikerrel teljesítettem. (A fennmaradó egy tárgylemez esetén összesen 500 sejt detekcióját tudtam elvégezni, ennek háttérében a vizsgált minta korai gesztációs kora, ezáltal relatív fejletlensége állhatott.)

Kutatásom alatt összesen 12000 sejtet vizsgáltam meg a CaseViewer programmal, szem ellenőrzése mellett a fent említett kritériumok alapján. Ezek közül összesen 11416 darab 13-as diszómiás sejtet, 171darab 13-as triszómiás sejtet és 35 darab 13-as monoszómiás sejtet jegyeztem fel. (2. táblázat)



20. ábra. Példa FISH reakciót követően detektálható sejtekről. Az A. nyíl diszómias petesejtre mutat: a diszómias sejtek két zöld és két narancsos-pirosas szignállal festődnek, sejthatárokat egyértelműen tiszteletben tartva. A B. nyíl által jelölt a triszómias sejtek három zöld és három narancsos pirosas szignállal rendelkeznek, a sejthatárokon belül. (saját ábra)



21. ábra. Az immunreakció és a FISH reakció párhuzamos bemutatása. Az (a) ábrán a sikeres immunreakciót követően zölden festődő, már meiózist megkezdett STAG3 pozitív sejteket és a kéken festődő, praemeiotikus állapotban lévő STAG3 negatív sejteket láthatjuk.

A (b) ábrán a FISH reakciót láthatjuk ugyanazon a tárgylemezen (az immunreakció eltávolítását követően). A pirosan bekarikázott sejtben látható három zöld és három narancsos-piros szignál jelzi azon sejt triszómiás voltát.

A két sejt egyidejű analizésére A CaseViewer program adott lehetőséget, az összekapcsolt lemezek segítségével könnyen párhuzamosan megítélhető volt a két külön felépített reakció. (saját ábra)

2. táblázat: Kutatásunk alatt megvizsgált sejtek és szignálok száma

Az összepárosított lemezeken átlagosan ezer STAG3 pozitív és STAG3 negatív sejt szemmel történő ellenőrzését és megszámlolását végeztem, szigorú kritériumrendszer alapján, ezáltal kizárásra került minden olyan sejt, ahol az immunreakció nem egyértelmű, esetleg homályos, vagy a kromoszómák száma nem felelt meg a követelményeknek (pl. három darab zöld, azonban két darab narancsos-pirosas szignál a kromoszóma sérülését, nem pedig valódi triszómiát feltételez).

kromoszóma	Vizsgált sejtek száma	Szignálok száma				
		2 zöld/ 2 narancsos piros	3 zöld/ 3 narancsos piros	1 zöld/ 1 narancsos piros	3 szignál	5 szignál
13	12000	11416	171	35	168	210
%		95,1%	0,14 %	0,029%	0,14 %	1,75 %

Az eredmények a következők lettek:

Tárgylemezenként átlagosan 916 STAG3 pozitív és 928 STAG3 negatív sejtet analizáltam.

Minden tárgylemez esetén találtam 13 triszómiás petesejtet, mindkét célcsoportban.

A 13-as triszómiás sejtek aránya a STAG3 pozitív sejtek esetén 2.04 % volt (0.8-3 % terjedő tartományban).

A 13-as triszómiás sejtek aránya a STAG3 negatív sejtek esetén 0.91 % volt (0.4 – 1.5 % terjedő tartományban.) (3. táblázat)

A kontroll mintákban 13-as triszómiás sejtet nem találtam, annak aránya 0 % volt.

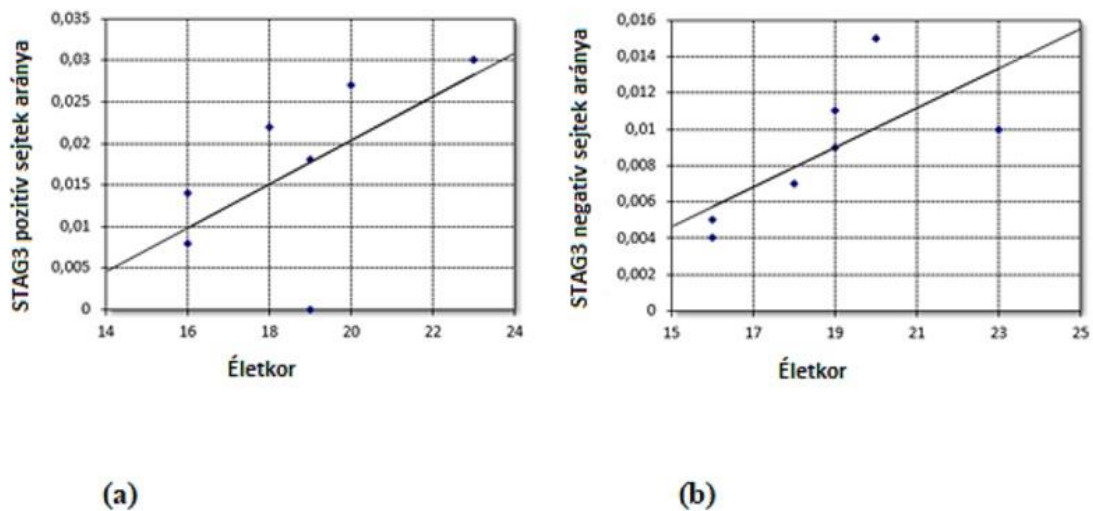
Vizsgálataim során a negyedik célkitűzésemet teljesítettem, bizonyítva, hogy a STAG3 negatív, ezáltal még premeiotikus állapotban lévő sejtekben a 13-as triszómia szignifikánsan van jelen. Minden vizsgált mintánál fellelhető volt STAG3 negatív 13-as triszómiás petesejt, az átlagos arány a STAG3 negatív sejtek esetén 0.91 % volt (0.4 – 1.5 % terjedő tartományban), míg a STAG3 pozitív sejtek esetén 2.04 % volt (0.8-3 % terjedő tartományban). (3. táblázat)

3. táblázat: A 13-as triszómiás sejtek előfordulási aránya a STAG3 pozitív és STAG3 negatív petesejtekben a 16-23 hetes leánymagzatok petefészkében.

Eset sorszám	Terhességi kor (gestációs hét)	13-as triszómiás sejtek (%)		
		Összesen (%)	Meiotikus profázisban lévő sejtek STAG3 pozitív	Premeiotikus őssejtek és stromasejtek STAG3 negatív
1.	16	13/2000 (0.65)	8/1000 (0.80)	5/1000 (0.50)
2.	16	9/1000 (0.90)	7/500 (1.40)	2/500 (0.40)
3.	18	29/2000 (1.45)	22/1000 (2.20)	7/1000 (0.70)
4.	19	9/1000 (0.90)	0/1000 (0)	9/1000 (0.90)
5.	19	29/2000 (1.45)	18/1000 (1.80)	11/1000 (1.10)
6.	20	42/2000 (2.10)	27/1000 (2.70)	15/1000 (1.50)
7.	23	40/2000 (2.00)	30/1000 (3.00)	10/1000 (1.00)
Átlagosan		171/12000 (1.42)	112/5500 (2.04)	59/6500 (0.91)

Az adatok elemzésekor igazolódott, hogy a tárgylemezeken fellelhető triszómiás sejtek mennyisége a gesztációs korral szignifikánsan emelkedik.

(Ez az adat a STAG3 pozitív sejtek esetén $r=0.93$, STAG3 negatív sejtek esetén $r=0.85$, $p=0.0071$) (22. ábra)



22. ábra. A triszómiás sejtek száma a terhességi kor függvényében.

A grafikon megmutatja, hogy a STAG3 pozitív 13-as triszómiás ivarsejtek (a) és a STAG3 negatív 13-as triszómiás ivarsejtek (b) száma szignifikánsan emelkedik a terhességi kor függvényében.

(A STAG3 pozitív sejteknél $r=0.93$, $p=0.0038$, a STAG3 negatív sejteknél $r=0.85$, $p=0.0071$). (saját ábra)

5. Megbeszélés

Az aneuploidia a kromoszómaszám a szabályostól egy vagy több kromoszómával történő eltérését jelenti, ilyen lehet a triszómia ($2n+1$), vagy a monoszómia ($2n-1$). A kromoszómaszámok abnormalitásai létrejöhetnek meiotikus és mitotikus osztódás során egyaránt. A mitotikus non-diszjunkció szomatikus sejteket és gamétákat és érinthet, a legkorábbi embrionális sejtosztódásokra jellemző: az ilyen állapot mozaicizmust eredményez, ennek során egyes sejtek abnormális kromoszómaszámmal bírnak, míg más sejtek teljesen normálisak. A meiotikus non-diszjunkció csak gamétákat érint: itt meg kell különböztessünk első és második meiotikus osztódás során bekövetkezett kóros állapotot.

A gyakori triszómiák eredete az intenzív kutatások ellenére sem tisztázott egyértelműen, azonban a jelenleg széles körben elfogadott klasszikus eredetmodell szerint a meiotikus non-diszjunkció okozhatja a triszómiát egy eredetileg diszómias petesejtben (Gosh S, 2017).

Újabb kutatások szerint azonban eltérő hatásmechanizmus állhat bizonyos aneuploidiák hátterében: Hultén és mtsai a petesejt mozaicizmus modell során bebizonyították a praemeiotikus mitotikus non-diszjunkció jelentőségét a 21-es triszómia kialakulásában (Hultén és mtsai, 2008).

Dolgozatomban a Patau szindrómát okozó 13-as triszómia lehetséges eredetére kerestem a megoldást, melynek alapját az ivarsejtek kóros fejlődése képezi.

Az oogenesis kezdetén a primordiális csírasejtek a nőnemű gonadba vándorolnak, azonnal oogoniumokká differenciálódnak, ahol számos mitotikus osztódáson mennek keresztül. A meiózis megkezdését követően a profázis I szakaszában a sejtosztódás leáll, az oogonium primer oocytává alakul és diplotén állapotában nyugalmi szakaszba kerül és az első meiotikus osztódásukat a pubertásig szünetelteti. Ennek hátterében az oocyta érési inhibitor (OMI) szerepel, mely a folliculus sejtek által termelt fehérje.

A pubertáskor kezdetén a növekvő folliculusok halmaza alakul ki, mely folyamatos utánpótlásban részesül a primordiális tüszőkből.

Minden ovarialis ciklusban több folliculus indul fejlődésnek, azonban az esetek legnagyobb részében csak egy éri el a teljes érettséget. Az érett folliculusban luteinizáló hormon (LH) hatására a meiózis I befejeződik, ennek során két, összességében 46 kromoszómát tartalmazó leánysejt keletkezik: a szekunder oocyta és az első sarki test. A

sejtek ezt követően belépnek a meiózis II fázisába, a folyamat azonban a metafázis során (az ovulációt közvetlenül megelőzve) blokkolódik. A meiózis II csak az oocyta megtermékenyítésekor fejeződik be, a végeredmény ekkor egy, 23 kromoszómát tartalmazó oocyta, és 3 sarki test lesz.

A nőkben a kromoszóma eltérések esélye és ezáltal az aneuploidiák előfordulása az életkorral növekszik (különösen 35 év felett): ez egy tapasztalati tény. Az elméleti háttér igazolására számos hipotézis született, melyek közül egyik sem nyert egyértelmű bizonyítást.

2008-ban Hultén és munkacsoportja a Down-szindróma kialakulásának egészen eltérő magyarázatára derítettek fényt: véleményük szerint a kórkép háttere a petesejt mozaicizmusban keresendő, melynek oka a tradicionális dogmától jelentősen eltérő premeiotikus mitotikus non-diszjunkció: ez alapján az aneuploidiáért felelős hiba így már a premeiotikus mitozisban, a primitív csírarsejtek nagy mennyiségű számtartó osztódása során létrejön, ezzel már egy eleve triszómiás petesejt kerül az oogenezis további fázisaiba és a meiózis során csupán „szükségszerű”, ún. szekunder- nondiszjunkció lép életbe.

Hultén és munkacsoportja az anyai életkor aneuploidiát fokozó hatására is szolgáltak magyarázattal: a 21-es triszómiás sejtek, összehasonlítva diszómiás társaikkal, érésükben lemaradnak, tehát a diszómiás petesejtek gyorsabban érnek meg és kerülnek ovulációra, ezért a számuk gyorsabban csökken, mint triszómiás társaiké. Ennek eredményeképpen arányaiban több triszómiás petesejt ragadhat a petefészekben az előrehaladott anyai életkorra, amely jelentős kockázatemelkedést jelenthet triszómiás terhesség kialakulására.

Az elméletet 14-22 hetes, fenotípusosan euploid lánymagzatok petefészkeinek vizsgálatával bizonyították: a post mortem eltávolításra került petefészkekből különféle érési fázisban lévő oocyta, mesenchymalis és primordiális csírarsejt vizsgálatára alkalmas preparátumokat készítettek. A preparátumokat több napos immunhisztokémiai vizsgálatnak vetették alá, ennek során a meiózisba lépett és még a meiózis előtt álló sejtek szétválasztását végezték a meiózis specifikus STAG3 fehérjére specifikus antitesttel. Az egymástól elválasztott sejteket ezt követően FISH vizsgálatnak vetették alá, ahol minden esetben találtak a diszómiás petesejtek mellett triszómiás petesejteket és primordiális

csírasejteket is. A diszómias sejtek mellett átlagosan a sejtek 0,54%-a 21-es triszómias volt, ez az arány a STAG3 pozitív és STAG3 negatív sejtekben nagyságrendileg megegyezett: ebből arra következtethetünk, hogy már az egyedfejlődés kezdeti szakaszában is megjelenik bizonyos fokú aneuploidia a petesejtek között és ez a környezeti tényezőktől és egyéb hatásoktól független, különbség csak a triszómias és az egészséges sejtek fogyási ütemében van.

Néhányan megkérdőjelezték a petesejt mozaicizmus modell létjogosultságát: 2012-ben Morris és munkacsoportja nyolc, karyotípus alapján euploid, 10-14 hetes magzati petefészket vizsgált, ahol a kontroll mintához képest nem mutatkozott szignifikáns különbség a petesejtekben talált mozaicizmushoz képest (a sejtek mindössze 0,025 %-a bizonyult triszómiasnak). Az ellentétes eredmény okát az eltérő immunfluoreszcens és FISH módszertanon kívül a vizsgált magzatok alacsony gesztációs korában kereshetjük: az elmélet fontos eleme, hogy a triszómias sejtek az oogenezis részeként a praemeiotikus mitózisok során szaporodnak.

Tekintettel arra, hogy az elmélet eddig csak a 21-es triszómia esetén került bizonyításra, azonban rendkívüli jelentősége miatt fontosnak tartottam annak lehetséges kiterjesztését, fő célkitűzésemmé azt tettem, hogy alkalmazható-e a petesejt mozaicizmus modell, mint az aneuploidia eredete, más kromoszóma rendellenességek esetén is?

Az elméletet alkalmazhatóságát a Patau-szindrómát okozó 13-as triszómia esetében vizsgáltam meg, hiszen a kórkép klinikai jelentősége kiemelkedő, vizsgálhatósága pedig a nála gyakoribb aneuploidiáknál sokkal egyszerűbb, hiszen nem okoz olyan gyakran spontán magzati elhalást igen korai terhességi korban.

A megfelelő kromoszóma kiválasztását követően Hultén és munkatársai által megfogalmazott irányelvek alapján kezdtem meg a kutatómunkát.

Kutatómunkám során az elvégzendő lépéseket négy fő célkitűzés köré csoportosítottam, ezek képezték a vizsgálataim fő irányvonalát.

Első célkitűzésem volt a Semmelweis Egyetem I. sz. Szülészeti és Nőgyógyászati Klinika által rendelkezésemre bocsátott, nem genetikai okból történt spontán vetélésen, vagy középídő vetélésindukción átesett 16-23 hetes leánymagzatok ováriumainak

sikeres izolálása, majd azokból touch preparation technikával vizsgálatra alkalmas metszetek, tárgylemezek készítése.

Második célkitűzésem a minták gyűjtése mellett a rendelkezésre álló tárgylemezeken párhuzamosan elkezdve Hultén és munkatársai által szolgáltatott minta alapján a meiózisba került sejtek praemeiotikus őssejtektől és stromasejtektől történő differenciálása volt: ennek kivitelezéséhez immunfluoreszcenciás vizsgálatot végeztem a STAG3-antitest segítségével.

A második célkitűzésem sikeres teljesítését követően elkezdődhetett a tárgylemezek fluorescens in situ hibridizációs vizsgálata, mely lehetőséget teremtett harmadik célkitűzésem teljesítéséhez. Ennek során a 13-as triszómia jelenlétét és pontos arányát tudtuk vizsgálni a STAG3 pozitív és STAG3 negatív sejtekben egyaránt: az immunreakcióról és FISH reakcióról készült nagy felbontású felvételeket a CaseViewer programmal párhuzamosan analizáltam, tárgylemezenként átlagosan 1000 darab STAG3 pozitív és 1000 darab STAG3 negatív sejtet ellenőriztem le szabad szemmel az előzetesen bescannelt nagy felbontású felvételekről.

Minden tárgylemez esetén találtam 13-as triszómiás ovariumsejtet, mindkét célcsoportban. A 13-as triszómiás sejtek aránya a STAG3 negatív sejtek esetén 0.91 % volt (0.4 – 1.5 % terjedő tartományban). A 13-as triszómiás sejtek aránya a STAG3 pozitív sejtek esetén 2.04 % volt (0.8-3 % terjedő tartományban). A kontroll mintákban 13-as triszómiás sejtet nem találtam, annak aránya 0 % volt.

Az adatok elemzésekor igazolódott, hogy a negyedik célkitűzésem során elsőként sikerült bizonyítanom hogy az eddig csak 21-es triszómiára vizsgált petesejt mozaicizmus modell sikerrel alkalmazható a Patau szindróma hátterében álló 13-as triszómiára is.

A fent nevezettek sikeres bizonyításán kívül igazoltuk, hogy a tárgylemezeken fellelhető triszómiás sejtek mennyisége a gesztációs korról szignifikánsan emelkedik.

Az elmélet megerősítésre került, ez jelentős pont az aneuploidiák patomechanizmusának pontosabb feltérképezésében. Milyen gyakorlati jelentőséget tulajdoníthatunk ennek?

Hultén és mtsai feltételezésének nyomán a triszómiás petesejtek a normál petefészekszövetben már eleve jelen vannak kromoszómális mozaicizmus részeként, mely a 21-es kromoszóma premeiotikus szegregációs hibájára vezethető vissza, feltételezhetően egy nagyon korai mitózis során. Ez elméletünket követve nem eseti eltérés, hanem a prenatális fejlődés része. Hultén és mtsai alapján lehetséges, hogy a 21-es triszómiás petesejtek megmenekülnek az apoptózistól, ezáltal fennmaradnak és akkumulálódnak a petefészekben (Hultén és mtsai, 2008).

A petesejt mozaicizmus modell alapján tehát az életkor előrehaladtával a triszómiás/diszómiás petesejtek aránya fokozatosan emelkedik, miközben az összpetsesejtszám folyamatosan csökken (Hultén és mtsai 2010). Számarányuk és gyorsabbérésük miatt nagy valószínűséggel a diszómiás petesejtek jutnak el az ovulációig, idősebb anyai életkorban viszont fokozódik annak a veszélye, hogy egy triszómiás petesejt is kiválasztódjon, megérjen és ovuláljon.

Ha a számos ovuláció során hamarabb kerülnek ovulációra az egészséges, diszómiás petesejtek és minél több ovuláció történik, annál nagyobb esélye lesz annak, hogy egy triszómiás sejt is ovulációra kerül, ezáltal szekunder non-diszjunkción keresztül aneuploidiát okozva.

Mit jelenthet ez a gyakorlatban?

Minden olyan hatás, ami az ovulációt, és ezáltal a petesejtek számának idő előtti csökkenését gátolja, hasznos lehet a triszómiák előfordulásának csökkentésében. Egy nő életében történő ovulációk számát és minőségét számtalan tényező határozhatja meg. Ilyen pl. a menarche, a menstruációs ciklusok hossza, vagy egyéb okok miatt kimaradt ovulációk száma, mint pl. a terhesség és a szoptatás, vagy az orális hormonális fogamzásgátlók.

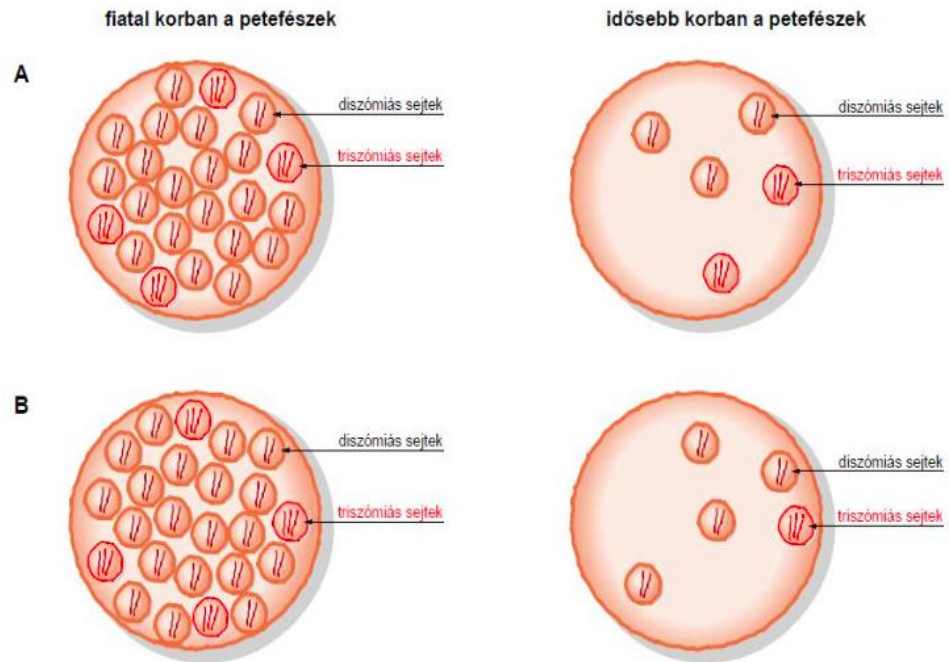
Az orális hormonális fogamzásgátlók (OAC) hatásukat a hipotalamusz-hipofízis-ovarium tengely mentén valósítják meg. A kis mennyiségű ösztrogén és/vagy gesztagén komponens hatására a gonadotropin felszabadító hormon (GnRH) gátlás alá kerül, mely

a tüszőérést serkentő hormon (FSH) és luteinizáló hormon (LH) gátlását eredményezi, ennek következtében az ovuláció elmarad. (Az orális hormonális fogamzásgátlók méhnyak nyákban és méhnyálkahártyában is változásokat eredményez, azonban kutatásunk fő irányvonala miatt ezen hatásokra nem térek ki részletesen.) (Borsos és Urbancsek, 2009).

Az OAC hatásmechanizmusának fő eredménye az ovuláció gátlása, azonban az ovuláció gátló hatás következtében hosszú távon nem marad több petesejt a petefészekben, hiszen az apoptózis következtében a petesejtek száma folyamatosan csökken. Valószínűsíthető azonban, hogy az apoptózis egyformán hat mind a triszómiás, mind a diszómiás petesejtekre, így az ovuláció gátlásakor a triszómiás/diszómiás petesejtek aránya változatlan marad. Mivel a fokozott számú ovulációk a triszómiás/diszómiás petesejtek arányát rontja, az ovuláció gátlásával egy kedvezőbb arányszám őrizhető meg a későbbi életkorra. (23. ábra)

Horányi és mtsai szerint szignifikáns különbség van az OAC-t használók körében, az OAC használat hosszát illetően is a Down-szindróma előfordulását tekintve az OAC nem használókhoz viszonyítva, eredményeik ezáltal alátámaszthatják a petesejt mozaicizmus modell hipotézisét. (Horányi D, 2017)

Eredményeik alapján felvethető, hogy a szájon át szedhető hormonális fogamzásgátló tabletták alkalmazása (és ezáltal a hosszú távú ovulációgátlás) egyik fontos, hosszú távú hatása lehet az aneuploidiák megjelenésének csökkentése.



23. ábra. A triszómiás/diszómiás sejtarányok romlása a petefészekben. A 21-es triszómiás sejtek, összehasonlítva a diszómiás petesejtekkel, érésükben lemaradni látszanak (Horányi D, 2019): **A:** Feltételezések szerint a triszómiás sejtek érésükben lemaradnak diszómiás társaikhoz képest, ennek következtében relatív arányszámuk az idő előrehaladtával megemelkedhet a petefészekben. Ez a folyamat posztnatálisan is folytatódik, egészen az ovulációig. **B:** A hosszú távú orális hormonális fogamzásgátlás az ovulációk számának csökkentésével fejt ki előnyös hatását: lassítja a petefészekből elfogyó diszómiás sejtek számát, segítve a triszómiás/diszómiás arányok megőrzését. Az illusztráción az apoptózis következtében csökkenő petesejt szám látható, miközben orális hormonális fogamzásgátlás mellett a triszómiás/diszómiás arány kedvezőbb az idő előrehaladtával.

6. Következtetések

1. Tudományos munkám során a 16-23 hetes, nem genetikai okok miatt történt spontán, vagy középidoős vetélésindukción átesett leánymagzatok petefészkeinek begyűjtését és feldolgozását sikeresen elvégeztem.

A feldolgozott petefészkek gyűjtése során arra következtettem, hogy bár a touch-preparation előkészítési technika és a lehető leggyorsabb feldolgozás jelentősen elősegíti a minták vizsgálatát, azonban a kísérlet sikeressége szempontjából a vizsgálható csírasejtek száma a legfontosabb paraméter. Az általunk feldolgozott tárgylemezek közül csak egy lemez esetén nem jártunk sikerrel, itt a korai terhességi kor miatt feldolgozható sejtek száma nem volt megfelelő, nem tudtuk elérni az általunk célként kitűzött 1000 STAG3 pozitív és STAG3 negatív sejt megszámlálását.

2. A sikeresen begyűjtött mintákban az anti-STAG3 antitestten alapuló immunreakció alkalmazásával eredményesen különválasztottam a premeiotikus és már meiózist megkezdett sejteket, majd fluorescens in situ hybridizációs módszer segítségével munkám során elsőként alkalmaztam e két módszer kombinációját a 13-as triszómiás sejtek elemzésére.

3. Dolgozatomban elsőként tudtam megerősíteni, hogy a 21-es triszómia kialakulásában Hultén és mtsai által bizonyítottan szerepet játszó petesejt mozaicizmus jelen van a 13-as triszómia patogenezisében is.

A tradicionális dogmától jelentősen eltérő premeiotikus mitotikus non-diszjunkció bebizonyítására immunhisztokémiai és fluorescens in situ hybridizációs módszereket alkalmaztunk, az általunk vizsgált minták mindegyikénél találtunk 13-as triszómiás praemeiotikus sejteket.

4. Az általam vizsgált 16-23 hetes leánymagzatok ovariumában fellelhető triszómiás sejtek száma mindkét (STAG3 pozitív és STAG3 negatív) sejtcsoportban a gesztációs kor növekedésével szignifikánsan emelkedett.

Ezzel a petesejt mozaicizmus egyik alappilléret is megerősítettük, hiszen bizonyítottuk, hogy a terhességi kor növekedésével a mitózisok száma, és ezáltal a triszómiás sejtek mennyisége is növekszik.

7. Összefoglalás

A gyakori triszómiák eredete az intenzív kutatások ellenére sem tisztázott egyértelműen. A jelenleg széles körben elfogadott klasszikus eredetmodell szerint egy meiotikus non-diszjunkció okozhatja a triszómiát egy eredetileg diszómiás petesejtben. Ezzel éles ellentétben 2008-ban már publikálásra került egy új elmélet – a petesejt mozaicizmus modell – mint lehetséges patomechanizmus. Kutatásom megkezdésekor az elmélet létjogosultságát szerettem volna kiterjeszteni más, gyakran előforduló aneuploidiákra, választásom a 13-as triszómiára esett. Magzati ováriumszövetet gyűjtöttem a 16-23. gesztációs hétben lévő, fenotípusosan normális abortumokból, a lemezeket touch preparation technikával készítettem elő a további vizsgálatokra. Első lépésként a meiózis-specifikus stromal antigen 3 (STAG3) ellenes immunológiai próbával differenciáltam a STAG3 pozitív, meiózisba lépett sejteket a STAG3 negatív sejtektől. Ezt követően ugyanazon tárgylemezen fluoreszcens in situ hibridizációs (FISH) analízist alkalmaztam a 13-as kromoszóma azonosítására és számszerűsítésére. A reakciókat fluoreszcens feltétellel rendelkező fénymikroszkóppal analizáltam. A minták analízisét a CaseViewer szövettani metszetek nagy felbontású képeinek összekapcsolt elemzésére alkalmas programjával végeztem, így az immunreakció és FISH reakció „összedolgozva” segítette munkámat. Minden tárgylemezen ezer darab STAG3 negatív és ezer darab STAG3 pozitív sejt szigorú kritérium rendszer alapján történő elemzését és megszámlolását végeztem. Minden vizsgált petefészek minta esetén észleltem 13-as triszómiát a STAG3 negatív és STAG3 pozitív sejteknél egyaránt. A 13-as triszómiás sejtek aránya a STAG3 negatív sejtek esetén 0.91 %, míg a STAG3 pozitív sejtek esetén 2.04 % volt. Az adatok elemzésekor igazolódott, hogy a tárgylemezeken fellelhető triszómiás sejtek mennyisége a gesztációs korról szignifikánsan emelkedik.

Ha elfogadjuk azt a hipotézist, hogy a triszómiás petesejtek érésükben lemaradni látszanak a normál petesejtekhez képest, lehetséges, hogy a triszómiás petesejtek megmenekülnek az apoptózistól, ezáltal fennmaradnak és akkumulálódnak a petefészekben, mely az életkor előrehaladtával a triszómiás/diszómiás petesejtek arányát fokozatosan rontja. Így az életkor előrehaladtával egyre nagyobb esélye lesz a triszómiás petesejt ovulációra kerülésének, mely az anyai emelkedett életkort, mint fokozott kockázati tényezőt támasztja alá.

8. Summary

Despite intensive research, the origin of common trisomies is not clear. According to the currently widely accepted classical model, a meiotic non-disjunction can cause trisomy in an originally disomic ovum. In sharp contrast, a new theory - the oocyte mosaicism model - was already published in 2008 as a possible pathomechanism. At the beginning of my research, I wanted to extend the theory to other common aneuploidies; my choice fell on trisomy 13. Fetal ovarian tissue was collected at 16-23th weeks of gestation from phenotypically normal abortions; the plates were prepared by touch preparation technique for further studies. As a first step, I used an immunological test against meiosis-specific stromal antigen 3 (STAG3) to differentiate STAG3 positive cells from STAG3 negative cells. Subsequently, fluorescent in situ hybridization (FISH) analysis was used on the same slide to identify and quantify chromosome 13. The reactions were analyzed by electron microscopy. The sample analysis was performed with CaseViewer program for the combined analysis of high-resolution images of histological sections, so the immune response and the FISH response “worked together” to help my work. I analyzed and counted one thousand of STAG3 negative and one thousand of STAG3 positive cells based on a strict criteria system on each slide. Trisomy 13 was detected in both STAG3 negative and STAG3 positive cells in all ovarian samples examined. The proportion of trisomy 13 cells was 0.91% for STAG3 negative cells and 2.04% for STAG3 positive cells. Analysis of the data showed that the amount of trisomy cells on slides increased significantly with gestational age.

If we accept the hypothesis that trisomy oocytes appear to lag behind normal oocytes in maturation, it is possible that trisomic oocytes escape apoptosis, thereby persisting and accumulating in the ovary. There will be an increasing chance of a trisomic oocyte to ovulate with advancing age, supporting advanced maternal age as an increased risk factor for common trisomies.

9. Irodalomjegyzék

Allen EG, Freeman SB, Druschel C, Hobbs CA, O'Leary LA, Romitti PA, Royle MH, Torfs CP, Sherman SL. (2009) Maternal age and risk for trisomy 21 assessed by the origin of chromosome nondisjunction: a report from the Atlanta and National Down Syndrome Projects. *Hum Genet*, 125:41-52.

Batees H, Altirkawi KA. (2014) Trisomy 18 syndrome: Towards a balanced approach. *Sudan J Paediatr.*, 14(2): 76-84.

Barlow AL, Tease C, Hultén MA. (2002) Meiotic chromosome pairing in fetal oocytes of trisomy 21 human females. *Cytogenet Genome Res*, 96: 45–51.

Borsos A, Urbancsek J. A női nemi szervek élettani működése és funkcionális zavarai. In: Papp Z. (szerk.) *A szülészeti-nőgyógyászat tankönyve*. Semmelweis Kiadó, Budapest, 2009:76-77.

Borsos A, Urbancsek J. Meddőség és fogamzásgátlás. In: Papp Z. (szerk.) *A szülészeti-nőgyógyászat tankönyve*. Semmelweis Kiadó, Budapest, 2009:117-118.

Busciglio J, Pelsman A, Wong C, Pignino G, Yuan M, Mori H, Yankner BA. (2002) Altered metabolism of the amyloid B precursor protein is associated with mitochondrial dysfunction in Down's syndrome. *Neuron*, 33: 677-688.

Brook JD, Gosden RG, Chandley AC. (1984) Maternal ageing and aneuploid embryos - Evidence from the mouse that biological and not chronological age is the important influence. *Hum Genet*, 66:41-45.

Cereda A, Carey JC. (2012) The trisomy 18 syndrome. *Orphanet J Rare Dis*. 7:81.

Cheng EY, Chen YJ, Bonnet G, Gartler SM. (1998) An analysis of meiotic painting in trisomy 21 oocytes using fluorescent in situ hybridization. *Cytogenet Cell Genet* 80:48-53.

Crawford D, Dearmun A. (2017) Klinefelter syndrome. *Nurs Child Young People*. 10,29 (6):19

Cooper KW. (1948) new theory of secondary non-disjunction in female *Drosophila melanogaster*. *Proc Natl Acad Sci USA*, 134: 179–187.

Duarte AC, Menezes AI, Devens ES, Roth JM, Garcias GL, Martino-Roth MG. Patau syndrome with a long survival. A case report. *Genet Mol Res*. 2004; 3(2): 288-92.

Eichenlaub-Ritter U. (1998) Genetics of oocyte ageing. *Maturitas*, 30:143-169.

Faddy MJ, Gosden RG, Gougeon A, Richardson SJ, Nelson JF. (1992) Accelerated disappearance of ovarian follicles in mid-life: implications for forecasting menopause. *Hum Reprod*, 7:1342-1346.

Freeman SB, Taft LF, Dooley KJ, Allran K, Sherman SL, Hassold TJ, Khoury MJ, Saker DM. (1998) Population-based study of congenital heart defects in Down syndrome. *Am J Med Genet*. 80: 213-217.

Freeman SB, Yang Q, Allran K, Taft LF, Sherman SL. (2000) Women with a reduced ovarian complement may have an increased risk for a child with Down syndrome. *Am J Hum Genet*, 66:1680-1683.

Gaulden ME. (1992) Maternal age effect: The enigma of Down syndrome and other trisomic conditions. *Mutation Research*, 296:69-88.

German J. (1968) Mongolism, delayed fertilization and human sexual behavior. *Nature*, 217:516-518.

Ghosh S, Feingold E, Dey SK. (2009) Etiology of Down syndrome: Evidence for consistent association among altered meiotic recombination, nondisjunction and maternal age across populations. *Am J Med Genet A*, 149:1415–1420.

Ghosh S, Hong CS, Feingold E, Ghosh P, Ghosh P, Bhaumik P, Dey SK. (2011) Epidemiology of Down syndrome: new insight into the multidimensional interactions among genetic and environmental risk factors in the oocyte. *Am J Epidemiol*, 174:1009–1016.

Hall HE, Chan ER, Collins A, Judis L, Shirley S, Surti U, Hoffner L, Cockwell AE, Jacobs PA, Hassold TJ. The origin of trisomy 13. *Am J Med Genet A* 2007; 143A (19): 2242-8.

Hassold T, Jacobs PA. Trisomy in man. *Annu Rev Genet* 1984; 18: 69-97.

Hassold T, Sherman S. (2000) Down syndrome: genetic recombination and the origin of the extra chromosome 21. *Clin Genet*, 57: 95-100.

Henderson SA, Edwards RG. (1968) Chiasma frequency and maternal age in mammals. *Nature*, 218:22-28.

Hook EBH. Prevalence, risk, and recurrence. In: (ed.) Brock DJH, Rodeck CH, Ferguson - Smith MA. *Prenatal Diagnosis and Screening*. Churchill Livingstone, Edinburgh, 1992:351-392

Horányi D, Babay LÉ, Győrffy B, Nagy GR. (2018) A terhességet megelőzően alkalmazott hosszabb távú orális fogamzásgátlás mint a magzati 21-es triszómia lehetséges kockázatsökkentő tényezője idős anyai életkorban vállalt terhességben. *Orv Hetil*, 28:1146-1152

Horányi D, Babay LÉ, Rigó J Jr, Győrffy B, Nagy GR. (2017) Effect of extended oral contraception use on the prevalence of fetal trisomy 21 in women aged at least 35 years. *Int J Gynaecol Obstet*, 138: 261–266.

Horányi D, Babay LÉ, Rigó J Jr, Győrffy B, Nagy GR. (2018) Erratum to "Effect of extended oral contraception use on the prevalence of fetal trisomy 21 in women aged at least 35 years" *Int J Gynecol Obstet*, 140:258.

Hultén MA, Öijerstedt L, Iwarsson E, Jonasson J. (2014) Maternal germinal trisomy 21 in Down syndrome. *J Clin Med*, 3:167-75.

Hultén MA, Patel S, Jonasson J, Iwarsson E. (2010) On the origin of the maternal age effect in trisomy 21 Down syndrome: the Oocyte Mosaicism Selection model. *Reproduction*, 139: 1–9.

Hultén MA, Patel SD, Tankimanova M, Westgren M, Papadogiannakis N, Jonsson AM, Iwarsson E. (2008) On the origin of trisomy 21 Down syndrome. *Mol Cytogenet*, 1: 21-31.

Hultén MA, Patel SD, Westergren M, Papadogiannakis N, Jonsson AM, Jonasson J, Iwarsson E. (2010) The paternal origin of trisomy 21 Down syndrome. *Mol Cytogenet*, 23:4-12.

Hunt PA, Hassold TJ. (2008) Human female meiosis: what makes a good egg go bad? *Trends Genet*, 24:86-93.

Iourov IY, Vorsanova SG, Yurov YB. (2008) Chromosomal mosaicism goes global. *Mol Cytogenet*, 1: 26-33.

Ishikawa H, Endo A. (1995) Combined effects of maternal age and delayed fertilization on the frequency of chromosome anomalies in mice. *Hum Reprod*, 10:883-886.

Jagiello GM, Fang JS, Nogawa T, Sung WK, Ducayen MB, Bowne W. (1987) Chromosome 21 behavior during fetal oogenesis in Down's syndrome. *Obstet Gynecol* 70:878-883.

Kline J, Kinney A, Levin B, Warburton D. (2000) Trisomic pregnancy and earlier age at menopause. *Am J Hum Genet*, 67:395-404.

Kline J, Levin B. (1992) Trisomy and age at menopause: predicted associations given a link with rate of oocyte atresia. *Paediatr Perinat Epidemiol*, 6:225-239.

Martin RH, Spriggs E, Ko E, Rademaker AW. (1995) The relationship between paternal age, sex ratios, and aneuploidy frequencies in human sperm, as assessed by multicolor FISH. *Am J Hum Genet*, 57:1395–1399.

McAuliffe ME, Williams PL, Korrick SA, Altshul LM, Perry MJ. (2012) Environmental exposure to polychlorinated biphenyls and p, p'-DDE and sperm sex-chromosome disomy. *Environ Health Perspect*, 120:535–540.

Merrick J. Incidence and mortality of Down syndrome. (2000) *Israel Med Assoc J*. 2:25-26.

Morgan T (2007) Turner syndrome: diagnosis and management. *Am Fam Physician*. 1, 76(3): 405-410.

Morris CR, Haigh S, Cuthbert G et al. (2012) Origin of trisomy: no evidence to support the ovarian mosaicism theory. *Prenat Diagn*. ; 32: 668-73.

Morris JK, Mutton DE, Alberman E. (2000) Revised estimates of the maternal age specific live birth prevalence of Down's syndrome. *Physiol Res*. 49:227-231.

Papp Z, Hajdu J. Congenitalis anomaliák, intrauterin (connatalis) infectiók. In: Papp Z. (szerk.) *A szüléset-nőgyógyászat tankönyve*. Semmelweis Kiadó, Budapest, 2009:429–430.

Papp Z, Tóth Z. Fogamzás és élettani terhesség. In: Papp Z. (szerk.) *A szüléset-nőgyógyászat tankönyve*. Semmelweis Kiadó, Budapest, 2009: 130-131

Papp Z, Tóth Z. Praenatalis magzati diagnosztika. In: Papp Z (szerk.), *A szüléset-nőgyógyászat tankönyve*. Semmelweis Kiadó, Budapest, 2007: 161-164.

Patau K, Smith DW, Therman E, Inhorn SL, Wagner HP. (1960) Multiple congenital anomalies caused by an extra autosome. 1: 790-793.

Pepling E. (2006) From primordial cell to primordial follicle: mammalian female germ cell development. *Genesis*, 44: 622-632.

Plaiasu V, Ochiana D, Motei G, Anca I, Georgescu A. (2010) Clinical relevance of cytogenetics to pediatric practice. Postnatal findings of Patau syndrome-Review of 5 cases. *Maedica (Buchar)*, 5 (3):178-185.

Pylyp LY, Spynenko LO, Verhoglyad NV, Mishenko AO, Mykytenko DO, Zukin VD. (2018) Chromosomal abnormalities in products of conception of first-trimester miscarriages detected by conventional cytogenetic analysis: a review of 1000 cases. *J Assist Reprod Genet*, 35:265-271.

Ray A, Hong CS, Feingold E, Ghosh P, Ghosh P, Bhaumik P, Dey S, Ghosh. (2016) Maternal telomere length and risk of Down syndrome: Epidemiological impact of smokeless chewing tobacco and oral contraceptive on segregation of chromosome 21. *Public Health Genomics*, 19: 11–18.

Rodrigo L, Rubio C, Mateu E, Simón C, Remohí J, Pellicer A, Gil-Salom M. (2004) Analysis of chromosomal abnormalities in testicular and epididymal spermatozoa from azoospermic ICSI patients by fluorescence in-situ hybridization. *Hum Reprod*, 19:118–123.

Roizen N, Patterson D. (2003) Down's syndrome. *Lancet*, 365: 1281-1289.

Sadler TW. Gametogenesis: A csírasejtek átalakulása férfi és női ivarsejtekké in: *Orvosi embriológia*. Medicina Könyvkiadó Zrt, Budapest, 2018:35-50.

Sanchez F. (2012) Molecular control of oogenesis. *Biochimica et Biophysica Acta*, 12:1896-1912.

Shimada TG, Watanabe G, Ingalls TN. (1980) Trisomies and triploidies in hamster embryos: induction by low-pressure hypoxia and pH imbalances. *Arch Environ Health*, 35:101-105.

Tease C, Fisher G. (1991) The influence of maternal age on radiation-induced chromosome aberrations in mouse oocytes. *Mutat Res*, 262:57-62.

Tease C, Fisher G. (1989) Further examination of the production-line hypothesis in mouse foetal oocytes. II. T(14;15)6Ca heterozygotes. *Chromosoma*, 93:447-45.

Tempaldo C, Vidal F, Estop A. (2011) Aneuploidy in human spermatozoa. *Cytogenet Genome Res*, 133:91-99.

Ohkura H. (2015) Meiosis: an overview of key differences from mitosis. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, 7(5):a015859.

Otter M et al. (2010) Triple X syndrome: a review of the literature. *Eur J Hum Genet*, Mar;18(3):265-71.

Uhlmann F. (1998) Cohesion between sister chromatids must be established during DNA replication. *Curr Biol* 8: 1095-1101.

Vegetti W, Van Assche E, Frias A, Verheyen G, Bianchi MM, Bonduelle M, Liebaers I, Van Steirteghem A. (2000) Correlation between semen parameters and sperm aneuploidy rates investigated by fluorescence in-situ hybridization in infertile men. *Hum Reprod*, 15:351–365.

Williams GM, Brady R. (2020) Patau syndrome. *StatPearls (Internet)*. Treasure island (FL): StatPearls Publishing, 2020. Jan.

Wolstenholme J, Angell RR. (2000) Maternal age and trisomy - a unifying mechanism of formation. *Chromosoma*; 109(7): 435-8.

Zheng CJ, Byers B. (1992) Oocyte selection: A new model for the maternal-age dependence of Down syndrome. *Hum Genet*, 90: 1–6.

10. Saját publikációk jegyzéke

10.1. Az értekezés témájában megjelent eredeti közlemények

Horányi D, **Babay LÉ**, Rigó J, Győrffy B, Nagy GR. (2017) Extended oral contraceptive application suppresses trisomy prevalence in women over 35 years of age. *Int J Gynaecol Obstet*, 138 (3): 261-266.

IF:2,072

Horányi D, **Babay LÉ**, Győrffy B, Nagy GR. (2018) A terhességet megelőzően alkalmazott hosszabb távú orális fogamzásgátlás, mint a magzati 21-es triszómia lehetséges kockázatsökkentő tényezője idős anyai életkorban vállalt terhességben. *Orv Hetil*, 159 (28): 1146-1152.

IF: 0,564

Babay LÉ, Horányi D, Győrffy B, Nagy GR. (2019) Evidence for the Oocyte Mosaicism Selection model on the origin of Patau syndrome (trisomy 13). *Acta Obstet Gynecol Scand*, 98 (12):1558-1564.

IF: 2,77

Babay LÉ, Horányi D, Rigó J, Nagy GyR. (2015) Új generációs szekvenálás és használata az aneuploidiák nem invazív prae-natalis vizsgálatában. *Orv Hetil*, 156: 1041-1048.

IF:0,291

IF: 3,061

A megjelelt folyóiratok összesített impaktfaktora: 5,697

11. Köszönetnyilvánítás

Szeretnék köszönetet mondani azoknak, akik a doktori munkám során személyes támogatásukkal a segítségemre voltak:

Témavezetőmnek, Dr. Nagy Gyula Richárdnak, aki kiemelkedő jártasságából fakadó alapos szakmai iránymutatása mellett személyes támogatásával, bizalmával és motivációjával a kezdetektől fogva megtisztelt, és a legfőbb segítségem volt doktori munkám során.

Gyurcsó-Deák Lindának, aki a labormunkálatok során pótolhatatlan szakmai segítséget nyújtott és mellette remek társaságnak bizonyult.

Munkahelyi vezetőmnek, Dr. Gyarmati Béla Főorvos Úrnak, aki a végsőig támogatott abban, hogy szakképzéssel párhuzamosan végezhessem doktori munkámat. Nagyon hálás vagyok az őszinte tanácsokért és a rám fordított időért: sokat tanulhattam tőle a megfelelő szakmai hozzáállásról, emberségről és végső soron önmagamról is.

Munkatársaimnak, akik a doktori munkám elkészítése érdekében sokszor helyettesítettek, és emellett minden apró sikeremnek önzetlenül örültek.

Szüleimnek, akik szeretetükkel és elismerésükkel megtanítottak rá, hogy az ember a végsőig küzdjön a céljaiért, akik az utolsó pillanatig mellettem álltak a kihívások előtt és az elsők voltak, akik a célvonalban állva örültek nekem.

Sosem szűnő támogatásukkal megmutatták, hogy milyen emberré és szülővé is szeretnék válni.

Testvéremnek, aki őszinte szeretete és törődése mellett megmutatta, hogy az ember ne féljen néha a saját útját járni.

Tominak, aki szakmailag, emberileg és lelkileg is biztonságot nyújtott a dolgozatom elkészítése során, aki elfogad annak, aki vagyok, és akihez mindig jó hazaérni.

Végül, de nem utolsó sorban köszönöm tanárainknak, barátainknak, Rozinak és családom többi részének a támogatását.