

Prof. dr hab. Alina T. Midro
Zakład Genetyki Klinicznej
Uniwersytet Medyczny
Białystok

Dr Jennifer Castañeda
Zakład Genetyki Medycznej
Instytut Matki i Dziecka w Warszawie

Genetyczne i epigenetyczne uwarunkowania niepłodności męskiej

Genetic and epigenetic determinants of male infertility

Abstrakt:

Nieprawidłowe funkcjonowanie genomu człowieka poprzez obecność aberracji chromosomowych, mutacji genowych albo wariantów polimorficznych, a także poprzez wadliwe działanie czynników epigenetycznych regulujących ekspresję poszczególnych genów może być powodem męskiej niepłodności albo bezdzietności. Efekt działania poszczególnych czynników manifestuje się na różnym etapie rozwoju człowieka, począwszy od stanu gamety męskiej, poprzez spermatogenezę i spermiogenezę, których zaburzenia manifestują się azoospermią czy oligozoospermią, aż do zaburzeń rozwoju potomstwa w okresie prenatalnym i postnatalnym, które mogą być letalne. Obecność aberracji chromosomowych w kariotypie, mikrodelecji chromosomu Yq czy mutacji genów stanowiących przyczyny rzadkich schorzeń genetycznych związanych z zaburzeniami niepłodności powinny być dziś oceniane także w powiązaniu ze schorzeniami epigenetycznymi.

Słowa kluczowe: aberracje chromosomowe, czynniki epigenetyczne, mikrodelecje, niepłodność męska, translokacje wzajemne, mutacje genomowe

Abstract:

Functional disturbances of the human genome caused by the presence of chromosomal aberrations, gene mutations or polymorphic variants, as well as through the dysfunction of epigenetic factors regulating the expression of individual genes, may cause male infertility or childlessness. The effect of each causative factor is manifested at various stages of human development ranging from the male gamete through spermatogenesis and spermiogenesis, disorders of which cause azoospermia or oligozoospermia, up to the occurrence of developmental disorders in the prenatal and postnatal period of progeny, including lethality. The diagnostic process of male infertility at present should include the evaluation of chromosomal aberrations in the karyotype, Yq microdeletions, mutations of genes associated with rare genetic disorders involving infertility in their symptomatology, in connection with epigenetic disorders.

Key words: chromosomal aberrations, epigenetic factors, genomic mutations, male infertility, microdeletions

Wprowadzenie

Płodność jest uwarunkowana zdolnością do wytwarzania komórek rozrodczych i możliwościami organizmu (kobiety i mężczyzny) zapewniającymi prokreację poprzez spotkanie komórki jajowej z plemnikiem, zakończone scaleniem informacji genetycznej przodków i przetworzeniem w materię nowego życia istoty ludzkiej. Kolejny etap to zabezpieczenie prawidłowych warunków rozwoju dziecka w organizmie matki od poczęcia do jego narodzin. Przyjęcie dziecka do rodziny poprzez macierzyństwo i ojcostwo jest podstawą naszego życia społecznego i jego rozwoju. Komplementarność cech kobiety i mężczyzny i zdolność do prokreacji jest związana z obecnością bazy danych genomu człowieka, zapisanej specyficznymi literkami za pomocą nukleotydów budujących cząsteczki kwasu dezoksyrybonukleinowego (DNA). W nich jest zawarta istotna informacja o strukturze organizmu, jego cechach i funkcjach oraz przebiegu rozwoju organizmu. Dlatego też genom człowieka nazywany jest księgą życia. Poznanie kolejności liter w tej księdze, czyli sekwencji DNA, dokonano na początku XX wieku w ramach Projektu Genomu Człowieka (NHGRI on line) National Human Genome Research Institute NHGRI The Human Genome¹. Przeczytanie ze zrozumieniem jednak tej księgi życia nie jest możliwe. Zrozumienie to poznanie wyrazów tej księgi, czyli funkcji (działania) poszczególnych genów i innych elementów. Skręcone nici DNA są odpowiednio upakowane w jądrze komórkowym i mitochondriach. W każdej komórce jest cała informacja genetyczna, indywidualny genom, czyli zbiór genów danego człowieka. Poszczególne geny są jednak osobno udostępniane do odczytu według określonego kodu i w sieci powiązań molekularnych, w różnym czasie w rozwoju i w różnych tkankach i też w relacji ze środowiskiem. Czuwa nad tym specjalne oprogramowanie genomu, nazywane epigenomem, czy też „nad-genomem” lub „drugim kodem”. To druga determinanta genetycznego uwarunkowania cech każdego człowieka, decydująca za pomocą swoistych mechanizmów, które geny (odcinki genomu) i w jakim czasie będą udostępniane do odczytu (transkrypcji) zawartą w nich informację. Sposób zarządzania kolejnością odczytywania informacji genetycznej poszczególnych genów czy decydowania o ich aktywności, czyli ekspresji, jest wpisywany na początku programu rozwojowego człowieka w formę organizacji chromatyny i znakowania wybranych fragmentów DNA do odczytu i może podlegać regulacjom środowiskowym (Hallgrimsson, Hall, 2011). Niektóre formy oprogramowania epigenetycznego DNA są też dziedziczne (Puri i in., 2010).

¹ Project <http://www.genome.gov/25019879>

Celem artykułu jest przedstawienie wybranych genetycznych i epigenetycznych uwarunkowań zaburzeń męskiej płodności. Efekt działania tych czynników manifestuje się na różnym etapie rozwoju człowieka i jego potomstwa. Zmiany mogą dotyczyć stanu gamety męskiej, zaburzeń poszczególnych etapów spermatogenezy czy spermiogenezy aż do momentu zapłodnienia. W okresie po zapłodnieniu mogą one też ograniczać przeżywalność potomstwa w okresie prenatalnym bądź w postnatalnym, prowadząc do bezdzietności.

1. Uwarunkowania genetyczne: aberracje chromosomowe

Podaje się, że obliczona według przekonywujących kryteriów częstość genetycznych przyczyn niepłodności z powodu zaburzeń spermatogenezy wynosi 5-30% (Esteves, 2013; Ferlin i in., 2007). Znacząca część tych zaburzeń spowodowana jest obecnością aberracji chromosomowych bądź mikrodelecji Yq (Stuppia i in., 1998).

Aberracje chromosomowe związane z niepłodnością mogą dotyczyć zarówno autosomów, jak i chromosomów płci, w tym są to aberracje liczbowe bądź strukturalne. Wykrywa się je w rutynowych badaniach kariotypu metodami GTG i/lub za pomocą FISH (*ang. Fluorescence in situ hybridization*). Jednym z bardziej znanych zespołów genetycznych z azoospermią jest zespół Klinefeltera (cechy kliniczne: wysoki wzrost, ginekomastia, brak mutacji głosu, małe jądra, niskie stężenie testosteronu), najczęściej uwarunkowany obecnością dodatkowego chromosomu X w kariotypie męskim – 47,XXY. Dodatkowy chromosom X powoduje zaburzenia funkcji genu *SRY* i jego produktu, który jest stymulatorem rozwoju gonady męskiej, co wraz z końcowym efektem rozwojowym doprowadza do produkcji hormonu, jakim jest testosteron. Jego pochodne mogą też wpływać na kształtowanie wewnętrznych i zewnętrznych narządów płciowych męskich (Sibler i in., 2002).

W podobny sposób niepłodni mogą być mężczyźni z kariotypem żeńskim 46,XX, u których obecność genu *SRY* związana jest z nieprawidłową rekombinacją części chromosomów płci, przemieszczającą fragment regionu pseudoautosomalnego krótkich ramion chromosomu Y (Y) na chromosom X (Skaletsky i in., 2003). Mikrodelecje w zakresie regionu pseudoautosomowego chromosomu Y mogą też mieć wpływ na płodność, ze względu zarówno na rodzaj utraconych genów, np. *SHOX* (Jorgez i in., 2011), jak i zmian polimorficznych (Krausz i in., 2012, Chianese i in., 2014).

Na długim ramieniu chromosomu Y w regionie Yq12, w pobliżu odcinku heterochromatynowego, znajduje się region AZF determinujący spermatogenezę. U niepłodnych mężczyzn może dochodzić do jego utraty wskutek mikrodelecji lub

różnych przegrupowań chromosomowych. Efekt kliniczny zależy od tego, który z odcinków tego regionu jest utracony: AZFa, AZFb czy AZFc, a także jakie są tam formy polimorficzne, tzw. *copy number variants* (CNVs). Ocena przegrupowań wymaga odpowiedniej diagnozy molekularnej (Noordam i in., 2011). Utrata wszystkich form AZF może prowadzić do poważnych konsekwencji w postaci zespołu SCOS (Sertoli-cell-only syndrome) (Silber i in., 2011). W regionie AZF zwraca uwagę obecność gen *USP9Y*, którego mutacja nie ogranicza płodności (Luddi i in., 2009). Jednak utrata genu *USP9Y* razem z sąsiedzkim genem *DDX3Y* ma poważne skutki kliniczne.

Badanie kariotypu u par małżeńskich z niepłodnością bądź bezdzietnością jest uzasadnione z uwagi na możliwość nosicielstwa aberracji chromosomowych strukturalnych, w tym inwersji lub translokacji chromosomowych wzajemnych (TCW), czy translokacji robertsonowskich. Podaje się, że u niepłodnych mężczyzn częstość występowania translokacji chromosomowych jest 7-10 razy wyższa niż u mężczyzn płodnych (Mafra i in., 2011, Hotaling i in., 2014). Nosicielstwo aberracji, w zależności od rodzaju zaangażowanych chromosomów i położenia miejsc złamania, może prowadzić do niepłodności wywołanej zaburzeniami rozwoju narządów płci bądź ograniczeniami wytwarzania odpowiedniej ilości prawidłowo funkcjonujących komórek rozrodczych. Z uwagi na tworzenie się nierównoważonych gamet wskutek niesymetrycznego rozdziału i segregacji chromosomów z utworzonych w mejozie tri- lub kwadriwalentów, mogą powstawać zaburzenia ograniczające przeżywalność potomstwa z nie zrównoważonym kariotypem, jeśli dojdzie do ich zapłodnienia. Konsekwencją mogą być: poronienia samoistne, ciążę obumarłe oraz zgony dzieci po urodzeniu, co prowadzi do bezdzietności (Midro, 2016a).

Przyczyną niezdolności mężczyzny do zapłodnienia mogą być uszkodzenia, utrata lub zmiana funkcji genów położonych w punkcie złamania aberracji chromosomowej jako tzw. efekt pozycji. Geny położone w punktach złamania mogą być przerwane albo odcięte od wpływu właściwych regulatorów ich ekspresji poprzez zmianę lokalizacji danego genu wraz z przegrupowaniem chromosomów z różnymi konsekwencjami klinicznymi, również dotyczącymi płodności. Zaobserwowano powtarzalność punktów złamań w określonych chromosomach u niepłodnych mężczyzn badanych z powodu zaburzeń spermatogenezy i braku potomstwa nawet w okresie prenatalnym, jak np. 1p13,1q12, 1q21 (Wang i in., 2016), 3p13 (Zhang i in., 2018), 4q12 (Zhang i in., 2016) 10p15.1, 10p12, 10q10, 10q22.1, 10q24.2, 10q26.3 (Zhang i in., 2018). Ocena funkcji genów z tych punktów złamania wymaga jeszcze dalszych badań molekularnych, aby poznać bezpośrednią

przyczynę pierwotnej niepłodności męskiej wywołanej obecnością przegrupowań w indywidualnej translokacji chromosomowej.

Analiza położenia punktów złamania przeprowadzona w grupie nosicieli TCW posiadających potomstwo z niezrównoważonym kariotypem z wadami letalnymi wykazała powtarzalność położenia punktów złamania zlokalizowanych w 2p23, 2p13, 2p11.2, 2q31, 2q37 (Zhang i in., 2017), a w chromosomie 5 w 5p15 (Zhang i in., 2018). Podane obserwacje dotyczyły nosicieli TCW z zaburzeniami spermatogenezy w formie zaburzeń ruchliwości i morfologii plemników przy zachowaniu ich prawidłowej liczby, jak i możliwości penetracji komórek jajowych. Wymaga to dalszej oceny, chociaż już na tym etapie wyniki wskazujące na możliwość uzyskania potomstwa mogą mieć wartość predykcyjną do zastosowania w poradnictwie genetycznym. Ostatnie badania tzw. regulomu, pozwalające oceniać punkty złamania translokacji metodami molekularnymi, będą mogły wyjaśnić mechanizm funkcjonowania genów położonych w punktach złamania chromosomów w relacji do zaburzeń płodności nosicieli obserwowanych TCW (Dixon i in., 2015). Badania własne rodzinnej $t(1;2)(q42;q33)$ wykazały bezdzietność wybiórczo u męskich nosicieli (Stasiewicz-Jarocka i in., 2000). Należy te punkty złamania również uwzględniać przy interpretacji przyczyn niepłodności męskiej.

Określenie położenia punktów złamania w translokacji chromosomowej jest istotnym elementem diagnostycznym również z uwagi na ocenę relacji położenia punktu złamania wobec telomeru i centromeru chromosomu, co wyznacza kształt figury rekombinacji synaptycznej w czasie mejozy i determinuje formy niezrównoważenia kariotypu w gametach powstałych po segregacji chromosomów homologicznych i pochodnych po translokacji. Podczas mejozy podczas pachytenu figura kwadriwalentu w wyniku asocjacji utworzona z pochodnych chromosomów po translokacji jest niesymetryczna, gdy punkty złamania są zlokalizowane blisko centromerów obu chromosomów pochodnych. Sprzyja to tworzeniu się regionów asynapsy, co powoduje, że komórka może wchodzić na drogę apoptozy, blokując dalszy przebieg spermatogenezy. Na prawidłowy przebieg spermatogenezy wpływa bowiem kompletność asocjacji synaptycznej, czyli wytworzenie kompleksu synaptycznego chromosomów zaangażowanych w translokację koniugujących z prawidłowymi chromosomami homologicznymi.

W przypadku translokacji chromosomowych robertsonowskich, które powstają w wyniku złamania i utraty ramion krótkich chromosomów akrocentrycznych, tworzenie się figur triwalentu w pachytenie mejozy powoduje powstanie wolnych ramion krótkich homologicznych chromosomów akrocentrycznych, które nie mają swych odpowiedników w translokowanym chromosomie. Sprzyja to tworzeniu się połączeń heterologicznych pomiędzy

asynaptycznymi segmentami akrocentryków a innymi chromosomami. Ponieważ w mejozie męskiej najczęściej nieskoniugowane są chromosomy płci, może powstać wówczas heterosynapsa pomiędzy akrocentrykiem a wolnym chromosomem płci albo asocjacja pomiędzy triwalem i tzw. pęcherzykiem płci częściowo koniugujących chromosomów X-Y. Ważnym czynnikiem, który sprzyja asocjacji, może być obecność regionów NOR (organizujących jąderka) na akrocentrykach. Chromosomy akrocentryczne, które nie mają regionów NOR, nie wykazują asocjacji triwalem z biwalem X-Y. Konsekwencją połączenia triwalem z X-Y może być rozszerzenie inaktywacji kompleksu X-Y na autosomy i tworzenie centralnej asynapsy wokół punktu złamania. Asocjacje triwalentu koniugujących chromosomów z pęcherzykiem X-Y oraz tworzenie centralnej asynapsy poprzez zahamowanie aktywności genów autosomowych prowadzą do zwiększonej apoptozy spermatocytów II rzędu, a tym samym do zatrzymania procesu spermatogenezy. Zjawisko nieprawidłowej, zwiększonej kondensacji chromosomów w triwalencie, położonych w pobliżu skondensowanego nieaktywnego transkrypcyjnie pęcherzyka płciowego XY u mężczyzn z ograniczoną płodnością, obserwowano wielu badaczy (Midro i in., 2016b).

Udział chromosomu Y w translokacji z chromosomem autosomowym [t(Y;A)], w przeciwieństwie do t(X;A), nie zawsze prowadzi do ograniczenia płodności. W kariotypie płodnych mężczyzn, nosiciele translokacji Y;A, punkt złamania leży zazwyczaj w obrębie lub poniżej prążka Yq12, w regionie nieczynnej genetycznie heterochromatyny, natomiast u niepłodnych mężczyzn w regionie euchromatyny powyżej prążka Yq11 (czyli Yq11 ulega przemieszczeniu lub utracie). Nie spełniała tego warunku translokacja Y;6 z położeniem punktu złamania na Yq12 opisywana u niepłodnego mężczyzny przez Delobela i in. (1998). Translokację zidentyfikowano za pomocą klasycznych technik cytogenetycznych GTG, RBG, QFQ i CBG, a także techniki FISH z zastosowaniem sondy DYZ1. Ocenę położenia punktu złamania poparto badaniami molekularnymi PCR z użyciem genu *DAZ* i wykazano, że leży on poza regionem krytycznym, którego uszkodzenie prowadzi do azoospermii. Z tego względu określenie regionu krytycznego prążka Yq11, którego przerwanie w wyniku aberracji strukturalnej prowadzi do azoospermii i niepłodności męskiej, jest niewystarczające i wymaga dalszych badań technikami molekularnymi, dotyczącymi zwłaszcza regionu AZF. Wydaje się, że również ważnym czynnikiem prognostycznym może być zawartość genetyczna partnerskich chromosomów autosomowych i stan genów w punkcie złamania.

Podobne skutki kliniczne może mieć nosicielstwo TCW autosomów, z zaangażowaniem chromosomów akrocentrycznych. Akrocentryki wykazują bowiem w tetradzie mejotycznej opóźnienie koniugacji w obrębie segmentów zawierających

ramiona krótkie i częstsze tworzenie się asocjacji z pęcherzykiem płciowym X-Y. Wskutek asynapsy często obserwuje się konfigurację łańcucha zamiast pierścienia. Sprzyja to niesymetrycznej segregacji chromosomów 3:1 w porównaniu do segregacji 2:2 i przez to wzrasta częstość tworzenia się niezrównoważonych gamet z aneuploidią (Rosenmann i in., 1985). Aneuploidia może być istotnym czynnikiem obumierania spermatocytów. Wykazano bowiem istotną statystycznie większą częstość aneuploidii u mężczyzn ze złą jakością nasienia w porównaniu do płodnych mężczyzn (Olszewska i in., 2016). Pośrednio wyjaśniałoby to niższą częstość rodzenia się dzieci z wadami u par małżeńskich, w których mężczyzna jest nosicielem translokacji autosomowej, prowadzącej do niezrównoważonej translokacji poprzez segregację 3:1 w porównaniu do par małżeńskich, gdzie kobieta jest nosicielką takiej translokacji. Innym powodem zaburzeń z tytułu obecności translokacji lub inwersji lub innych aberracji strukturalnych jest powstawanie swoistych patologii u potomstwa na skutek jednorodzicielskiej disomii w wyniku niezrównoważenia kariotypu, czyli powstawania delecji lub duplikacji regionów podlegających piętnowaniu lub naprawy postzygotycznej stanu aneuploidalnego (Midro, 2011). Piętnowanie genomu (*ang. genomic imprinting*) jest związane z procesem epigenetycznym, blokującym odczyt specyficznej grupy genów, co prowadzi do ekspresji genów w zależności od ich pochodzenia ojcowskiego lub matczynego. Znanych jest około 70–80 genów położonych w określonych regionach chromosomów (Barlow, 2011). Zmiany w procesie piętnowania genomowego są przyczyną poważnych schorzeń u potomstwa ujawniających się po urodzeniu, takich jak z. Beckwitha -Wiedemanna, z. Russella-Silvera, z. Albrighta, z. Pradera-Williego, z. Angelmana oraz schorzeń wieku późniejszego jak wady serca, nadciśnienie, cukrzyca czy zaburzenia psychiczne (Kochański i in., 2016).

U niepłodnych mężczyzn nosicieli translokacji chromosomowych lub inwersji może dochodzić też do zahamowania spermatogenezy, zwłaszcza w późniejszym wieku, także w wyniku tzw. efektu interchromosomowego, związanego z powstawaniem dodatkowo aneuploidii u nosicieli translokacji chromosomowych, co aktualnie można wykazać, badając plemniki metodą FISH (Godo i in., 2013).

2. Uwarunkowania genetyczne: mutacje genomowe

W diagnostyce przyczyn genetycznych niepłodności męskiej uwzględnia się poza aberracjami chromosomowymi rzadkie schorzenia genetyczne, spowodowane mutacją/mutacjami w jednym lub w wielu genach, w obrazie klinicznym których występują zaburzenia płodności. Do takich schorzeń zalicza się wrodzony brak lub zwłóknienie nasieniowodów (CAVD – congenital absence of the vas deferens)

(Moskowitz i in., 2008) oraz zespół Kallmanna, charakteryzujący się hipogonadyzmem hipogonadotropowym i zaburzeniami węchu.

CAVD jest powodowane mutacjami genu *CFTR* (cystic fibrosis transmembrane conductance regulator) i występuje u mężczyzn niewykazujących typowych objawów mukowiscydozy ze strony układu oddechowego i pokarmowego, chociaż te objawy mogą się pojawić w późniejszym okresie. W obrazie klinicznym CAVD występuje jednostronna lub obustronna hipoplazja bądź aplazja nasieniowodów i pęcherzyków nasiennych. Rozwój jądra oraz spermatogeneza są zwykle prawidłowe. CAVD stwierdza się w trakcie diagnostyki przyczyn niepłodności lub przypadkowo podczas zabiegów chirurgicznych, np. orchidopexji. Objawami nasuwającymi podejrzenie CAVD są: oligospermia lub azospermia, niska objętość ejakulatu o specyficznym profilu biochemicznym (niskie pH, obniżone stężenie fruktozy, zaburzenia koagulacji), nieprawidłowości pęcherzyków nasiennych lub nasieniowodów w badaniu USG, brak nasieniowodów w badaniu palpacyjnym. CAVD jest weryfikowany testem molekularnym, wykazującym obecność patogennych mutacji w obu allelach genu *CFTR* (Ong i in., 2001).

CAVD występuje u ok. 1.2-1.7% niepłodnych mężczyzn i u 25% mężczyzn z obstrukcyjną azospermią (Yu i in., 2012). Wykonana w roku 2012 metaanaliza dotycząca mutacji w genie *CFTR* u pacjentów z rozpoznaniem obustronnego braku nasieniowodu (CBAVD) wykazała, że u 78% pacjentów występuje przynajmniej jedna mutacja w genie *CFTR*, u 46% pacjentów stwierdza się dwie mutacje, a u 28% jedną mutację. Najczęstsze genotypy stanowią F508del/5T i F508del/R117H (z częstością odpowiednio 17% and 4%). Najczęściej identyfikowanymi mutacjami są F508del (17% alleli), IVS8-5T (25% alleli), R117H (3% alleli) (Yu i in., 2012).

Ważnym elementem poradnictwa genetycznego w przypadku identyfikacji mutacji w genie *CFTR* u mężczyzny jest wykonanie badań molekularnych w kierunku nosicielstwa mutacji w genie *CFTR* u jego małżonki, celem określenia ryzyka wystąpienia mukowiscydozy u potomstwa.

Zespół Kallmanna jest jedną z przyczyn opóźnionego dojrzewania płciowego. Występuje z częstością 1:10000 i charakteryzuje się hipogonadyzmem hipogonadotropowym (niedobór wydzielania gonadoliberyny, niskie stężenie LH, FSH) oraz zaburzeniem (brakiem lub upośledzeniem) węchu (Biczysko-Mokosa i in., 2015). Połączenie objawów hipogonadyzmu hipogonadotropowego z brakiem lub upośledzeniem węchu tłumaczy się zaburzeniem migracji neuronów wydzielających gonadoliberyny oraz zaburzeniem aksonów węchowych podczas embriogenezy (Wosnitzer, 2014). Zespół Kallmanna objawia się w wieku wczesnodziecięcym małym prąciem lub wnętrstwem. Nastolatkowie i dorośli mężczyźni wykazują kliniczne cechy hipogonadyzmu i opóźnienia dojrzewania płciowego. Do nich

należą: brak wtórnych cech płciowych, obniżona masa mięśniowa, niepłodność. Mogą wystąpić również inne cechy fenotypowe: wrodzona wada serca, niedosłuch, wady nerek, rozszczep warg/podniebienia, szczelina tęczęwki, zaburzenia widzenia, lustrzane ruchy rąk, wysoki wzrost, anomalie w układzie kostnym, ginekomastia.

Schorzenie jest uwarunkowane genetycznie u 20-30% pacjentów, u których opisano zmiany w ponad 20 genach. Analiza genu *ANOS1(KAL1)* jest wskazana u rodzin wykazujących dziedziczenie sprzężone z chromosomem X. Dziedziczenie autosomalne dominujące jest związane z mutacjami w genach *CHD7*, *FGFR1*, *FGF8* i *SOX10*, a dziedziczenie autosomalne recesywne ze zmianami w genach *FEZF1*, *PROK2* i *PROKR2* (Balasubramanian, Crowley, 2007)

Postępowanie terapeutyczne polega na substytucji testosteronem. Celem uzyskania płodności (indukcja spermatogenezy) stosuje się okresowe leczenie ludzką gonadotropiną kosmówkową (hCH – odpowiednik LH) z gonadotropiną menopauzalną (HMG – odpowiednik FSH), ewentualnie ludzką rekombinowaną FSH. U większości mężczyzn (28%-80%) leczenie jest skuteczne i udaje się przywrócić spermatogenezę (Biczysko-Mokosa i in., 2015).

3. Czynniki epigenetyczne

W przypadku niepłodności męskiej u tych mężczyzn, u których uda się wykluczyć genetyczne uwarunkowania, należy wówczas rozważyć diagnostykę epigenetycznych uwarunkowań powstawania zaburzeń. Badania regulacji epigenetycznych genów aktualnie cieszą się dużym zainteresowaniem, skoro udało się już opracować takie techniki badań molekularnych, które pozwalają oceniać, w jaki sposób ekspresja poszczególnych genów może być regulowana i modyfikowana (Riggs i in., 1996; Liyanage i in., 2014).

Regulacje epigenetyczne funkcjonowania genomu są dokonywane poprzez metylację DNA, modyfikacje stopnia kondensacji chromatyny, między innymi poprzez różnorodne modyfikacje histonów oraz działanie niekodującego RNA. Każdy z tych mechanizmów wpływa na przebieg spermatogenezy i funkcje prokreacyjne mężczyzny. Z gametogenezą związany jest epigenetyczny proces metylacji DNA już od momentu, kiedy komórki zawiązka linii płciowej (primordial germ cells – PGCs), wnikając do rozwijających się gonad, przechodzą proces demetylacji DNA, która potem będzie odnawiana w okresie prenatalnym u chłopców (Allegrucci i in., 2005; Black, 2011; Carrell, 2012; Mayer i in., 2000; Yanagimachi, 2005; van Montfoort i in., 2012; Schagdarsurengin i in., 2012).

Do metylacji DNA dochodzi najczęściej poprzez łączenie się grupy metylowej z cytozyną z dwunukleotydu CpG, tworząc 5-metylocytozynę (5mC) zazwyczaj

w regionie promotorowym genów. U niepłodnych mężczyzn zaobserwowano wysoki poziom asymetrycznej metylacji DNA w regionach poza wyspami CpG w męskich komórkach germinalnych (prospermatogonia), wskazując na spadek jej podczas podziałów mitotycznych oraz zaburzenia mechanizmu kopiowania metylacji DNA, obecnej poza wyspami CpG w prospermatogoniach (Ichiyanagi i in., 2013).

Bardzo ważnym okresem zmian epigenetycznych, związanym z metylacją histonów, jest okres spermiogenezy, podczas której dochodzi do wymiany histonów na protaminy związane z nabywaniem funkcji ruchliwości plemników i ochroną przed działaniem różnych niekorzystnych czynników środowiskowych. Zaburzenia tego procesu obserwuje się niejednokrotnie u niepłodnych mężczyzn (Aoki i in., 2005; Barker i in., 2002; de Mateo 2011; de Yebra i in., 1998; Torregrosa, 2006).

Podobnie zmiany na poziomie niekodującego mRNA genów włączonych w proces wymiany histonów na protaminy wykryto, badając metodą microarray transkryptom jąder prawidłowych i jąder mężczyzn z oligospermią (Hamatani, 2011; Kotaja, 2014).

W okresie spermatogenezy, kiedy dochodzi do wytwarzania spermatocytów podczas podziału mejotycznego, ma miejsce remetylacja wybranych odcinków DNA i modyfikacja histonów, zmieniająca kondensację chromatyny, aby ułatwić możliwości transkrypcji określonych genów. Nieprawidłowa modyfikacja epigenetyczna szeregu genów obserwowana była w jądrach niepłodnych mężczyzn. Navarro-Costa i in. (2010) opisali zaburzenia metylacji w genie *DAZL*, porównując nasienie grupy pacjentów z oligoasthenoteratozoospermią (OAT) do populacji mężczyzn z nasieniem prawidłowym. Podobnie Gatta i in. (2010) zwrócili uwagę na istotną rolę genu *DAZ* w utrzymaniu prawidłowej funkcji mRNA, która jest zaburzona u mężczyzn z niepłodnością z oligoazoospermią.

W badaniach Hammouda i in. (2010) dotyczących siedmiu genów związanych z procesem rodzicielskiego piętnowania genów (parental imprinting), a mianowicie *LIT1*, *MESTh*, *SNRPN*, *PLAGL1*, *PEG3*, *H19* oraz *IGF2*, wykazano, że zaburzenie wzoru ich metylacji korelowało z oligozoospermią bądź nieprawidłowym poziomem protaminy niepłodnych mężczyzn. Podobnie kolejne badania hypermetylacji DNA promotorów genów *MTHFR*, *PAX8*, *NTF3*, *SFN*, *HRAS*, *RASGFR1*, *GTL2*, *KCNQ1*, *LT1* wykazały wpływ na płodność u mężczyzn, wpływając na liczbę, ruchliwość i morfologię plemników. Zwrócono uwagę też na hypometylację genów regionu 1 kontrolującego genomowe piętno rodzicielskie IGF2/H19 u mężczyzn z obniżoną liczbą plemników i ograniczoną ruchliwością (Houshdaran i in., 2007; Kobayashi i in., 2007; Marques i in., 2008; Khazamipour i in., 2009; Popliński i in., 2010; Wu i in., 2010; Rajender, 2011).

Zmiany ruchliwości i morfologii plemników bez zmiany liczby w wyniku hypermetylacji promotora DNA genów *MTHFR* i *SNRPN* zaobserwowała grupa rumuńska (Botezatu i in., 2014).

Podsumowanie

Medycyna prokreacyjna, oferując różne sposoby pomocy niepłodnym małżeństwom, wymaga współdziałania ginekologów z genetykami i zapleczem diagnostycznym w zakresie rozpoznawania zmian chromosomowych, mutacji genowych i badania transkryptomu z uwzględnieniem zaburzeń jego epigenetycznej regulacji. Z jednej strony wykrycie zmian genetycznych bądź epigenetycznych może mieć istotne znaczenie w poznawaniu przyczyny zaburzeń, z drugiej zaś wyznacza wybór procedur w postępowaniu terapeutycznym. Każdy pacjent (para małżeńska) przed podjęciem decyzji o poszczególnych procedurach leczenia niepłodności powinien być poinformowany o możliwościach genetycznego podłoża zaburzeń i ich konsekwencjach, jak i możliwości nosicielstwa translokacji chromosomowych, mikrodelecji regionu AZF chromosomu Y, niewykrywalnej rutynowym badaniem kariotypu, czy też mutacji występujących w różnych genach odpowiedzialnych za rzadkie schorzenia genetyczne. Należy te zmiany uwzględniać w kontekście stosowanych metod zapłodnienia pozaustrojowego, bowiem mogą one indukować zaburzenia epigenetyczne u potomstwa (z. Beckwitha Wiedemana, z. Russella Silvera, z. Angelmana i inne) niezależnie od wad rozwojowych indukowanych samą procedurą. Rodzice przystępujący do takiej procedury powinni być uprzedzeni o tego typu zagrożeniach. Decyzja o poddaniu się testom genetycznym należy do pacjentów i ich rodzin z uwzględnieniem sesji informacyjnej, realizowanej w ramach poradnictwa genetycznego.

Bibliografia:

- Allegrucci C., Thurston A., Lucas E., Young L. (2005), *Epigenetics and the germline. Reproduction*, 129, 137–49.
- Aoki V.W., Moskovtsev S. I., Willis J., Liu L., Mullen J. B., Carrell D. T. (2005), DNA integrity is compromised in protamine-deficient human sperm, *Journal of Andrology*, 26, 741–48.
- Balasubramanian R, Crowley W. F. Jr. Isolated Gonadotropin-Releasing Hormone (GnRH) Deficiency. 2007 May 23 [Updated 2017 Mar 2]. (w:) Adam MP, Ardinger HH, Pagon RA, et al., editors. GeneReviews® [Internet]. Seattle (w): University of Washington, Seattle; 1993-2018.
Dostępny <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK1334/>

- Barker D. J., Eriksson J. G., Forsén T., Osmond C. (2002), Fetal origins of adult disease: strength of effects and biological basis, *International Journal of Epidemiology*, 31, 1235–1239.
- Barlow D.P. (2011), Genomic imprinting: a mammalian epigenetic discovery model, *Annual Reviews of Genetetics*, 45, 379–403.
- Biczysko-Mokosa A., Petriczko E., Horodnicka-Józwa A., Zespół Kallmanna – późne rozpoznanie i leczenie. *Endokrynologia Pediatria*, (2015), 14.1.50, 67-70.
Dostępny <http://endokrynologiapediatria.pl/?doi=10.18544/EP-01.14.01.1513>.
- Black J. C., Whetstine J. R., 2011, Chromatin landscape: methylation beyond transcription, *Epigenetics*, 6, 9–15.
- Botezatu A., Socolov R., Socolov D., Iancu I. V., Anton G. (2014), Methylation pattern of methylene tetrahydrofolate reductase and small nuclear ribonucleoprotein polypeptide N promoters in oligoasthenospermia: a case-control study, *Reproductive BioMedicine Online* 28(2), 225-31.
- Carrell D. T. (2012), Epigenetics of the male gamete, *Fertility and Sterility*, 97, 267-74.
- Chianese C., Gunning A. C., Giachini C., Daguin F., Balercia G., Ars E., Lo Giacco D., Ruiz-Castañe E., Forti G., Krausz C. (2014), X chromosome-linked CNVs in male infertility: discovery of overall duplication load and recurrent, patient-specific gains with potential clinical relevance, *PLoS ONE*, 9, e97746.
- Delobel B., Djelati R., Gabriel-Robez O., Croquette M.F., Rousseaux-Prevost R., Rousseaux J., Rigot J. M., Rumpler Y. (1998), Y-autosome translocation and infertility: usefulness of molecular, cytogenetic and meiotic studies, *Human Genetics*, 102, 98-102.
- de Mateo S., Ramos L., de Boer P., Meistrich M., Oliva R., 2011, Protamine 2 precursors and processing, *Protein and Peptide Letters*, 18, 778–85.
- de Yebra L., Balleca J.L., Vanrell J.A., Corzett M., Balhorn R., Oliva R. (1998), Detection of p2 precursors in the sperm cells of infertile patients who have reduced protamine p2 levels, *Fertility and Sterility*, 69, 755–759.
- Dixon J. R., Jung I., Selvaraj S., Shen Y., Antosiewicz-Bourget J. E., Lee1 A. Y., Ye1 Z., Kim A., Rajagopal N., Xie W., Diao Y., Liang J., Zhao H., Lobanenko V.V., Ecker J. R., Thomson J., Ren B. (2015), Chromatin Architecture Reorganization during Stem Cell Differentiation, *Nature* 19; 518(7539), 331–336.
- Esteves S.C. (2013), A clinical appraisal of the genetic basis in unexplained male infertility, *Journal of Human Reproductive Sciences*, 6, 176–182.
- Ferlin A., Raicu F., Gatta V., Zuccarello D., Palka G., Foresta C. (2007), Male infertility: role of genetic background, *Reproductive BioMedicine Online*, Jun, 14(6), 734-45.

- Gatta V., Raicu F., Ferlin A., Antonucci I., Scioletti A. P., Garolla A., Palka G., Foresta C., Stuppia L. (2010), Testis transcriptome analysis in male infertility: new insight on the pathogenesis of oligo-azoospermia in cases with and without AZFc microdeletion, *BMC Genomics*, 24;11, 401.
- Godo A., Blanco J., Vidal., Anton E. (2013), Accumulation of numerical and structural chromosome imbalances in spermatozoa from reciprocal translocation carriers, *Human Reproduction*, 28, 840-849.
- Hallgrimsson B., Hall B. K. (2011), *Epigenetics: Linking Genotype and Phenotype in Development and Evolution*, University of California Press: Oakland, CA, USA.
- Hamatani T. (2011), Spermatozoal RNA, profiling towards a clinical evaluation of sperm quality, *Reproductive BioMedicine Online* 22, 103.
- Hammoud S. S., Purwar J., Pflueger C., Cairns B. R., Carrell D. T. (2010), Alterations in sperm DNA methylation patterns at imprinted loci in two classes of infertility, *Fertility and Sterility*, 94(5), 1728-33.
- Hotaling J., Carrell D. T. (2014), Clinical genetic testing for male factor infertility: current applications and future directions, *Andrology*, 2, 339-50.
- Houshdaran S., Cortessis V.K., Siegmund K., Yang A., Laird P.W., Sokol R.Z. (2007), Widespread epigenetic abnormalities suggest a broad DNA methylation defect in abnormal human sperm, *PLoS ONE* 2, e1289.
- Ichiyanagi T., Ichiyanagi K., Miyake M., Sasaki H. (2013), Accumulation and loss of asymmetric non-CpG methylation during male germ-cell development, *Nucleic Acids Reserches*, 41, 738-45.
- Jorgez C.J., Weedin J.W., Sahin A., Tannour-Louet M., Han S., Bournat J.C, Mielnik A., Cheung S.W., Nangia A.K., Schlegel P.N., Lipshultz L.I., Lamb D.J. (2011), Aberrations in pseudoautosomal regions (PARs) found in infertile men with Y-chromosome microdeletions, *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, 96, E674-679.
- Khazamipour N., Noruzinia M., Fatehmanesh P., Keyhaneh M., Pujol P. (2009), MTHFR promoter hypermethylation I n testicular biopsies of patients with non-obstructive azoospermia: the role of epigenetics in male infertility, *Human Reproduction*, 24, 2361-2364.
- Kobayashi H., Sato A., Otsu E., Hiura H., Tomatsu C., Utsunomiya T., Sasaki H., Yaegashi N., Arima T. (2007), Aberrant DNA methylation of imprinted loci in sperm from oligospermic patients, *Human Molecular Genetetis* 1;16(21), 2542-51.
- Kochański A., Jopek A., Gadzinowski J., Midro A.T. (2016), *Zaburzenia genetyczne u potomstwa powstałe w związku ze stosowaniem metod zapłodnienia pozaustrojowego in vitro*, *Przegląd Pediatryczny*, 45, No 4/34-40.

- Kotaja N. (2014), MicroRNAs and spermatogenesis. *Fertility and Sterility*, 101, 1552–1562.
- Krausz C., Giachini C., Lo Giacco D., Daguin F., Chianese C., Ars E., Ruiz-Castane E., Forti G., Rossi E. (2012), High resolution X chromosome-specific array-CGH detects new CNVs in infertile males, *PLoS ONE*, 7, e44887.
- Liyanage V.R., Jarmasz J.S., Murugesan N., Del Bigio M.R., Rastegar M., Davie J.R. (2014). DNA modifications: function and applications in normal and disease States, *Biology (Basel)*, 3, 670–723.
- Luddi A., Margollicci M., Gambera L., Serafini F., Cioni M., De Leo V., Balestri P., Piomboni P. (2009), Spermatogenesis in a man with complete deletion of USP9Y, *The New England Journal of Medicine*, 360, 881–885.
- Mafra F.A., Christofolini D.M., Bianco B., Gava M.M., Glina S., Belangero S.I., Barbosa C.P. (2011), Chromosomal and molecular abnormalities in a group of Brazilian infertile men with severe oligozoospermia or non-obstructive azoospermia attending on infertility service, *International Brazilian Journal of Urology*, 37, 244-250.
- Marques C.J., Costa P., Vaz B., Carvalho F., Fernandes S., Barros A., Sousa M. (2008), Abnormal methylation of imprinted genes in human sperm is associated with oligozoospermia, *Molecular Human Reproduction*, 14(2), 67-74.
- Mayer W., Niveleau A., Walter J., Fundele R., Haaf T. (2000), Embryogenesis: demethylation of the zygotic paternal genome, *Nature*, 403, 501–502.
- Midro A.T. (2011), *Poradnictwo genetyczne*. (w:) *Genetyka medyczna. Podręcznik dla studentów i lekarzy* pod red. G. Drewy i T. Ferenc, Łódź.
- Midro A.T. (2016a.) Utrata ciąży jako wynik ograniczonej przeżywalności dzieci z wadami rozwojowymi, *Życie i Płodność*, 2016, 85-104. Wydawnictwo SWPR Warszawa, *Profilaktyka zaburzeń zdrowia prokreacyjnego: Wczesne niepowodzenia prokreacji – etiologia, prewencja i postępowanie w ujęciu interdyscyplinarnym*.
- Midro A.T. (2016b). Elementy seksomu w kształtowaniu się płci męskiej bądź żeńskiej osoby ludzkiej, (w:) *Gender – spojrzenie krytyczne*, J. Jagiełło i D. Oko (red.), 81-97, Kielce: Wydział Filozoficzny Uniwersytetu Papieskiego Jana Pawła II.
- Moskowitz S.M., Chmiel J. F., Sternen D.L., Cheng E., Gibson R.L., Marshall S.G., Cutting G.R. (2008), Clinical practice and genetic counseling for cystic fibrosis and CFTR-related disorders *Genetics in Medicine*, vol. 10, 851–868. doi:10.1097/GIM.0b013e31818e55a2
- Navarro-Costa P., Nogueira P., Carvalho M., Leal F., Cordeiro I., Calhaz-Jorge C., Gonçalves J., Plancha C. E. (2010). Incorrect DNA methylation of the DAZL

- promoter CpG island associates with defective human sperm, *Human Reproductive*, 25(10), 2647-2654.
- Noordam M.J., Westerveld G.H., Hovingh S.E., van Daalen S.K., Korver C.M., van der Veen F., van Pelt A.M., Repping S. (2011), Gene copy number reduction in the azoospermia factor c (AZFc) region and its effect on total motile sperm count, *Human Molecular Genetics*, 20, 2457–2463.
- Olszewska M., Barciszewska M.Z., Frączek M., Huleyuk N., Chernykh V.B., Zastavna D., Barciszewski J., Kurpisz M. (2017), Global methylation status of sperm DNA in carriers of chromosome structural aberrations, *Asian Journal of Andrology*, 19(1), 117-124.
- Ong T., Marshall S. G., Karczeski B.A. I in., Cystic Fibrosis and Congenital Absence of the Vas Deferens. 2001 Mar 26 [Updated 2017 Feb 2]. W: Adam MP, Ardinger HH, Pagon RA, et al., editors. GeneReviews® [Internet]. Seattle (WA): University of Washington, Seattle; 1993-2018.
Dostępny <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK1250/>
- Poplinski A., Tüttelmann F., Kanber D., Horsthemke B., Gromoll J. (2010), Idiopathic male infertility is strongly associated with aberrant methylation of MEST and IGF2/H19 ICR1, *International Journal of Andrology*, 33, 642–649.
- Puri D., Dhawan J., Mishra R.K. (2010), The paternal hidden agenda: epigenetic inheritance through sperm chromatin, *Epigenetics*, 5, 386–391.
- Rajender S., Avery K., Agarwal A. (2011), Epigenetics, spermatogenesis and male infertility, *Mutation Research*, 727, 62–71.
- Riggs A.D., Martienssen R.A., Russo V.E.A. (1996), *Introduction. In Epigenetic mechanisms of gene regulation*. Cold Spring Harbor: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Rosenmann A., Wahrman J., Richler C., Voss R., Persitz A., Goldman B. (1985), Meiotic association between the XY chromosomes and unpaired autosomal elements as a cause of human male sterility, *Cytogenetics and Cell Genetics*, 39(1), 19-29.
- Schagdarsurengin U., Paradowska A., Steger K. (2012), Analysing the sperm epigenome: roles in early embryogenesis and assisted reproduction, *Nature Reviews Urology*, 9, 609–619.
- Silber S. J. (2011), The Y chromosome in the era of intracytoplasmic sperm injection: a personal review, *Fertility and Sterility*, 95, 2439–48.
- Silber S.J., Disteche C.M., *Y Chromosome Infertility*. (2002), [updated 2012]. (w:) M.P. Adam, H.H. Ardinger, R.A. Pagon, S.E. Wallace, B.J.H. Bean, K. Stephens, A. Amemiya (rds.), GeneReviews®. Seattle (WA): University of Washington.

- Skaletsky H., Kuroda-Kawaguchi T., Minx P.J., Cordum H.S., Hillier L., Brown L.G., Repping S., Pyntikova T., Ali J., Bieri T., Chinwalla A., Delehaunty A., Delehaunty K., Du H., Fewell G., Fulton L., Fulton R., Graves T., Hou S.F., Latrielle P., Leonard S., Mardis E., Maupin R., McPherson J., Miner T., Nash W., Nguyen C., Ozersky P., Pepin K., Rock S., Rohlfing T., Scott K., Schultz B., Strong C., Tin-Wollam A., Yang S.P., Waterston R.H., Wilson R.K., Rozen S., Page D.C. (2003), The male-specific region of the human Y chromosome is a mosaic of discrete sequence classes, *Nature*, 19; 423(6942), 825-37.
- Stasiewicz-Jarocka B., Rączkiewicz B., Kowalczyk D., Zawada M., Midro A.T. (2000), Ryzyko genetyczne rodzin obciążonych translokacją chromosomową t(1;2)(q42;q33) GTG, RHG, QFQ, FISH, *Ginekologia Polska*, 71, 10, 1262-72.
- Stuppia L., Gatta V., Calabrese G., Guanciali Franchi P., Morizio E., Bombieri C., Mingarelli R., Sforza V., Frajese G., Tenaglia R., Palka G. (1998), A quarter of men with idiopathic oligo-azoospermia display chromosomal abnormalities and microdeletions of different types in interval 6 of Yq11, *Human Genetics*, 102(5), 566-570.
- Torregrosa N., Domínguez-Fandos D., Camejo M.I., Shirley C.R., Meistrich M.L., Ballescà J.L. (2006), Protamine 2 precursors, protamine 1/protamine 2 ratio, DNA integrity and other sperm parameters in infertile patients, *Human Reproduction*, 21, 2084–89.
- Wang R.X., Zhang H.G., Pan Y., Chen S., Yue F. G., Zhu D.L., Liu R.Z. (2016), Translocation breakpoints of chromosome 1 in male carriers: clinical features and implications for genetic counseling, *Genetics and Molecular Researches*, 5; 15(4).
- Wosnitzer M.S. (2014), Genetic evaluation of male infertility, *Translational Andrology and Urology*, Mar; 3(1), 17-26.
- Wu W., Shen O., Qin Y., Niu X., Lu C., Xia Y., Song L., Wang S., Wang X. (2010), Idiopathic male infertility is strongly associated with aberrant promoter methylation of methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR), *PLoS One*, 5(11), e13884.
- van Montfoort A.P., Hanssen L.L., de Sutter P., Viville S., Geraedts J.P., de Boer P. (2012), Assisted reproduction treatment and epigenetic inheritance, *Human Reproduction Update*, 18, 171–197.
- Yanagimachi R. (2005), Male gamete contributions to the embryo, *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1061, 203–207.
- Yu J., Chen Z., Ni Y., Li Z. (2012), CFTR mutations in men with congenital bilateral absence of the vas deferens (CBAVD): a systemic review and meta-analysis, *Human Reproduction*, 27(1), 25-35.

- Zhang H.G., Wang R.X., Pan Y., Zhu J.H., Xue L.T., Yang X., Liu R.Z. (2016), Translocation breakpoints of chromosome 4 in male carriers: clinical features and implications for genetic counseling, *Genetics and Molecular Researches*, 2, 15(4).
- Zhang X., Zhang H., Hu C., Wang R., Xi Q., Liu R. (2017), Clinical features of carriers of reciprocal chromosomal translocation involving chromosome 2: report of nine cases and review of the literature, *International Brazilian Journal of Urology*, 11, 43.
- Zhang H., Wang R., Li L., Jiang Y., Zhang H., Liu R. (2018), Clinical feature of infertile men carrying balanced translocations involving chromosome 10: Case series and a review of the literature, *Medicine (Baltimore)* 97(15), e0452.
- Zhang H., Wang R., Li L., Zhu H., Zhang H., Liu R. (2018), Translocation breakpoints of chromosome 3 in male carriers: a report of twelve cases and a review of the literature, *Turkish Journal of Medical Sciences*, 48, 150-156.
- Zhang H.G., Wang R.X., Pan Y., Zhang H., Li L.L., Zhu H.B., Liu R.Z. (2018), A report of nine cases and review of the literature of infertile men carrying balanced translocations involving chromosome 5, *Molecular Cytogenetics*, 25; 11, 10.

Źródła elektroniczne

Project <http://www.genome.gov/25019879>