

**VILNIAUS UNIVERSITETAS  
MEDICINOS FAKULTETAS**

Baigiamasis darbas

**Genominių pokyčių vertinimas pacientų su nevaisingumu grupėje**

**Evaluation of Genomic Factors in Patients with Infertility**

Studentas/ė (vardas, pavardė), grupė: **Jūratė Makauskaitė** VI kursas, 9 gr.

Katedra/ Klinika kurioje ruošiamas ir ginamas darbas  
institutas, **Žmogaus ir medicininės genetikos katedra**

**Biomedicinos mokslų**

Darbo vadovas

Doc. dr. Birutė Tumienė

Katedros arba Klinikos vadovas

Prof. (HP) dr. Algirdas Utkus

2023

Studento elektroninio pašto adresas

jurate.makauskaite@mf.stud.vu.lt

## TURINYS

<b>SANTRAUKA</b> .....	2
<b>SUMMARY</b> .....	2
<b>SANTRUMPŲ SĄRAŠAS</b> .....	3
<b>ĮVADAS</b> .....	4
<b>KLINIKINIŲ ATVEJŲ APRAŠYMAS</b> .....	9
<b>I ATVEJIS</b> .....	9
<b>II ATVEJIS</b> .....	11
<b>APTARIMAS</b> .....	12
<b><i>SPAG1 (SU SPERMA SUSIJUSIO ANTIGENO-1) GENO SĄSAJOS SU VYRŲ NEVAISINGUMU</i></b> .....	13
<b><i>KISS1 (KISS - 1 METASTAZIŲ SUPRESIJOS) GENO SĄSAJOS SU VYRŲ NEVAISINGUMU</i></b> .....	17
<b>IŠVADOS IR KLINIKINIAI PASIŪLYMAI</b> .....	19
<b>IŠVADOS</b> .....	19
<b>KLINIKINIAI PASIŪLYMAI</b> .....	20
<b>LITERATŪROS SĄRAŠAS</b> .....	21

## SANTRAUKA

Nevaisingumas yra negalėjimas pastoti porai gyvenant reguliarių lytinių gyvenimų ir nenaudojant kontraceptinių priemonių vienerius metus (1). Su šia būkle susiduria apie 7% vyrų populiacijos (2). Po diagnostinio ištyrimo, rekomenduojamo Europos Urologų Asociacijos, apie 40% vyrų, kurių spermatogenezė sutrikusi, etiologija taip ir lieka neaiški (3). Plačiai paplitus naujos kartos sekoskaitos metodui, atrandama vis daugiau monogeninių vyrų nevaisingumo priežasčių (4). Šiuo metu iš viso nustatyta bent 120 genų, kurie yra vidutiniškai, stipriai arba neabejotinai patikimai susiję su 104 nevaisingumo fenotipais (5). *SPAG1* (su sperma susijęs antigenas-1) dar nėra įtrauktas į su nevaisingumu siejamų genų sąrašą. Tačiau aprašytas kliniškas atvejis ir literatūros duomenys (funkciniai išorinių ir vidinių diencefalo šakų defekto lemiami spermatozoido žiuželio motorikos sutrikimai ir gyvūninių modelių: *Drosophila melanogaster*, *Etheostoma caeruleum*, *Sus scrofa domesticus*, tyrimai) pagrindžia, jog vyrų nevaisingumas – tikėtinas 28 tipo nejudrių žiuželių sindromo dėl *SPAG1* geno mutacijų kliniškas simptomas. Patogeninių *KISS1* (*KISS-1* metastazių supresijos) geno variantų sąsają su vyrų nevaisingumu įrodo aprašytas kliniškas atvejis bei literatūros duomenys (gyvūnų modelių tyrimai, aprašyti kitų pacientų reprodukciniai sutrikimai bei funkciniai tyrimai: geno koduojami kisseptinai veikia pagumburio-hipofizės-gonadų ašį, steroidogenezę ir spermatozoidų funkcijas).

**Raktažodžiai:** vyrų nevaisingumas; *SPAG1* genas; Kartagener sindromas; *KISS1* genas; hipogonadotropinis hipogonadizmas.

## SUMMARY

Infertility is a failure to achieve a pregnancy after a year of regular unprotected sexual intercourse (1). It affects approximately 7% of the male population (2). After the diagnostic investigation recommended by the European Association of Urology, the origin of infertility for about 40% of men with impaired spermatogenesis remains unclear (3). With the widespread use of Next-Generation Sequencing, a continuously increasing number of monogenic causes of male infertility are being identified (4). A total of 120 genes are moderately, strongly, or definitively linked to 104 infertility phenotypes (5). *SPAG1* (sperm-associated antigen-1) gene is not yet included in the list of male infertility-implicated genes. However, a case report and analysis of

current literature (functional impairment of sperm flagellar motility caused by defects in the outer and inner dynein arms and studies in animal models: *Drosophila melanogaster*, *Etheostoma caeruleum*, *Sus scrofa domesticus*) provide support for the conclusion that male infertility is a likely clinical symptom of primary ciliary dyskinesia-28 resulting from *SPAG1* mutations. Pathogenic variants of the *KISS1* (*KISS-1 metastasis suppressor*) gene are associated with male infertility, as supported by a case report and data from the literature review (animal model studies, reported reproductive disorders in other patients, and functional studies revealing that the gene-encoded kisspeptins have an impact on the hypothalamic-pituitary-gonadal axis, steroidogenesis, and spermatozoa functions).

**Keywords:** male infertility; *SPAG1* gene; Kartagener syndrome; *KISS1* gene; hypogonadotropic hypogonadism.

## SANTRUMPŲ SĄRAŠAS

OA – obstrukcinė azospermija;

NOA – neobstrukcinė azospermija;

FSH - folikulus stimuliuojantis hormonas;

LH - liuteinizuojantis hormonas;

TTE – testosteronas;

EAU - Europos Urologų Asociacija;

AZF - azospermijos faktorius;

CFTR - cistinės fibrozės transmembraninio laidumo reguliatorius (angl. cystic fibrosis transmembrane conductance regulator);

AZF – azospermijos faktorius;

KS – Klinefelterio sindromas

CBAVD – įgimtas abipusis sėklinių latakų neišsivystymas (angl. *congenital bilateral absence of the vas deferens*);

CF – cistinė fibrozė;

PCD – pirminė ciliarinė diskinezija;

GnRH – gonadotropiną atpalaiduojantis hormonas;

TESA - spermos ekstrakcija iš sėklidės (angl. *testicular sperm aspiration*);

ODA – išorinės dineino šakos (angl. *outer dynein arms*);  
IDA – vidinės dineino šakos (angl. *inner dynein arms*);  
KT – kompiuterinė tomografija;  
MRT – magnetinio rezonanso tomografija;  
NKS – naujos kartos sekoskaita;  
DNAAF – dineino aksoneminio surinkimo faktorius (angl. *dynein axonemal assembly factor*);  
IUGR – intrauterininis vaisiaus augimo sulėtėjimas.

## ĮVADAS

Nevaisingumas yra negalėjimas pastoti porai gyvenant normalų lytinį gyvenimą (reguliarūs lytiniai santykiai kas 2-3 dienas) ir nenaudojant kontraceptinių priemonių vienerius metus (6). Beveik 30 milijonų vyrų visame pasaulyje yra nevaisingi, o didžiausias vyrų nevaisingumas stebimas Vidurio ir Rytų Europoje (8-12 %) bei Australijoje (8-9 %) (7).

Nevaisingumo priežastys gali būti įvairios:

- spermos formavimosi ir brendimo sutrikimai:
  - infekcinės ligos;
  - endokrininiai pokyčiai;
  - imunologiniai sutrikimai;
  - varikocelė;
  - radiacijos, chemoterapijos poveikis.
- Anatomicinės kliūtys:
  - įgimti ar paveldėti sutrikimai, pokyčiai atsiradę dėl infekcijos;
  - randai, susidarę po ankstesnės chirurginės operacijos.
- Kitos priežastys:
  - impotencija;
  - per greita ejakuliacija;
  - retrogradinė ejakuliacija (8).

Atliekant vyro ištyrimą, reikėtų išsamiai surinkti anamnezę, atlikti fizinę apžiūrą, kurioje daugiausia dėmesio skiriama vyro lytiniams organams, ir bent vieną spermos tyrimą (9).

Spermograma yra „auksinio standarto“ tyrimas (6). Vertinami spermos mėginio koncentracijos,

morfologijos, judrumo ir spermos biocheminiai (pvz.: pH) pakitimai. Pagal spermogramą vyrų nevaisingumą galima suskirstyti į šias kategorijas:

- Azoospermija – spermatozoidų nebuvimas ejakuliate. Gali būti klasifikuojama kaip obstrukcinė azoospermija (OA) - spermatozoidų nebuvimas ejakuliate dėl spermos nutekėjimo problemų, arba neobstrukcinė azoospermija (NOA), kai spermatozoidų spermoje nėra dėl sutrikusios spermatozoidų gamybos. NOA sudaro 60% visų azoospermijos atvejų.
- Oligozoospermija – mažiau nei  $15-20 \times 10^6$  spermatozoidų ejakuliate.
- Sunki oligozoospermija – mažiau nei  $5 \times 10^6$  spermatozoidų ejakuliate.
- Normozoospermija – normali spermatozoidų koncentracija ejakuliate.
- Astenozoospermija – mažiau nei 50 % spermatozoidų yra mažai judrūs.
- Teratozoospermija – mažiau nei 30 % spermatozoidų yra normalios morfologijos.
- Aspermija – nesėkminga spermos ejakuliacija (10).

Taip pat tikslinga patikrinti folikulus stimuliuojančio hormono (FSH), liuteinizuojančio hormono (LH) ir testosterono (TTE) koncentracijas; atlikti ultragarsinį tyrimą. Įvertinus šiuos duomenis, vaisingumo sutrikimo priežastis nustatoma tik 60-70% pacientų (5,9).

Pagal Europos Urologų Asociacijos (EAU) gaires, genetinis tyrimas skiriamas, kai yra neobstrukcinė azoospermija, sunki oligospermija, arba vyrams, turintiems struktūrinių sėklinių latakų anomalijų (vienpusė arba abipusė sėklinių latakų aplazija be inkstų agenezės). Kariotipo tyrimas taip pat rekomenduojamas, nepriklausomai nuo spermos tyrimo rezultatų, jei šeimoje yra pasikartojančių persileidimų, įgimtų raidos ydų ar psichomotorinės raidos ir intelektinės negalios atvejų (6). Pažymėtina, kad šiuo metu tokios profesinės organizacijos kaip EAU rekomenduoja ribotą genetinį ištyrimą: 2021 m. atnaujintose EAU rekomendacijose nurodomi tik keli tradiciniai genetiniai tyrimai: kariotipo analizė, azoospermijos faktoriaus (*AZF*) delecijų vertinimas ir cistinės fibrozės transmembraninio laidumo reguliatoriaus (*CFTR*) geno tyrimas.

Kariotipo pokyčiai - viena iš pagrindinių šiuo metu žinomų vyrų nevaisingumo priežasčių. Dėl santykinai mažos kariotipo analizės skiriamosios gebos galima nustatyti tik stambias chromosomų anomalijas, tokias kaip aneuploidijos, Robertsono ir subalansuotos translokacijos bei inversijos (9). Kai kurios chromosomų aberacijos yra paveldimos, o kitos atsiranda *de novo* (2). Anomalijos gali būti skirstomos į lytinių chromosomų aneuploidijas, struktūrines chromosomų aberacijas ir kopijų skaičiaus pokyčius.

Dažniausia genetinė azoospermijos priežastis yra Klinefelterio sindromas (KS) (11). Apskaičiuota, kad Klinefelterio sindromo dažnis bendroje populiacijoje yra 1 iš 600, o tarp pacientų, sergančių neobstrukcine azoospermija, dažnis siekia 1 iš 7 (12). KS būdinga papildoma X chromosoma (47,XXY) (80-90 % atveju), todėl liga yra chromosominės aneuploidijos forma. KS taip pat gali būti mozaikinės formos (46,XY/47,XXY) ar su didesniu papildomų chromosomų skaičiumi (48,XXXY, 49,XXXXY) (13). Dėl papildomos X chromosomos vystosi sėklidžių hialinizacija, fibrozė ir sėklidžių hipofunkcija, atsiranda lytinių organų sutrikimai, dažniausiai hipogonadizmas ir nevaisingumas (14). Klasikiniam KS klinikiniam pasireiškimui būdinga vėluojantis lytinis brendimas, aukštas ūgis, ilgos galūnės, ginekomastija ir mažos sėklidės (15). Vis dėlto, pacientams gali būti nustatomas ir kitoks ligos pasireiškimo fenotipas, dažnai nustatomi tik nežymūs simptomai, todėl KS ne visada įtariamas iki pilnametystės ir gali būti diagnozuojama tik tuomet, kai vyras kreipiasi dėl nevaisingumo (14).

Struktūrinės chromosomų aberacijos, tokios kaip translokacijos ir inversijos, nustatomos iki 10% nevaisingų vyrų ir yra dažniausios oligospermijos priežastys (9). Translokacijos gali susidaryti dėl genetinės medžiagos mainų tarp nehomologinių chromosomų (reciprokinė translokacija) arba dėl dviejų akrocentrinių chromosomų ilgųjų pečių susiliejimo (Robertsono translokacija). Pacientams, kuriems nustatyta subalansuota chromosomų struktūrinė aberacija, dažniausiai būdingas normalus fenotipas ir jie neturi kitų simptomų, išskyrus nevaisingumą ar kartotinius persileidimus šeimoje (16). Su X chromosoma susijusios reciprokinės translokacijos dažnai sukelia azoospermiją. Autosomų translokacijos, tiek reciprokinės, tiek Robertsono, turi labai skirtingą poveikį spermatogenezėi: nuo azoospermijos iki beveik normalių spermos parametrų (11). Apskritai Robertsono translokacijos gali lemti vidutinio sunkumo, bet kintamą oligozoospermiją (11).

Jei kariotipo pokyčių nenustatyta, reikėtų pagalvoti apie galimas Y chromosomos mikrodelecijas; vyrų nevaisingumą gali lemti Y chromosomos ilgajame petyje (Yq) esančios azoospermijos faktoriaus srities mikrodelecijos. Yq yra penki kartotinių mikrodelecijų taškai, žymimi kaip *AZFa*, *AZFb*, *AZFb+c* (su dviem skirtingais lūžio taškais) ir *AZFc* delecijos. Šios mikrodelecijos retai pasitaiko bendroje vyrų populiacijoje (1:4000), o paplitusios tarp pacientų, sergančių idiopatine NOA (5-10 %) bei sunkia oligozoospermija (2-5 %) (17).

Su nevaisingumu taip pat siejamos ir monogeninės ligos. OA su įgimtu abipusiu sėklinių latakų neišsivystymu (CBAVD) – santykinai dažna autosominė recesyvinė liga, kurios

paplitimas siekia 1:1000. Vyrų su CBAVD nevaisingumas (OMIM:277180) daugiausia susijęs su *CFTR* geno mutacijomis (18). Sutrikimui būdingas didelis alelinis heterogeniškumas ir platus klinikinių pasireiškimų spektras nuo klasikinės cistinės fibrozės (CF) su plaučių ir kasos pažeidimu iki izoliuotos sėklinių latakų obstrukcijos (19). Visi CF sergantys vyrai yra nevaisingi dėl azoospermijos, kurią lemia visiškai neišsivystę, atrofuoti arba fibrozuoti Volfo latakai (20).

Pirminė ciliarinė diskinezija (PCD) – reta, įprastai autosominiu recesyviniu būdu paveldima liga (21), kurios paplitimas svyruoja nuo 1:10 000 iki 1:40 000 (22). Ligai būdingi judrių blakstienėlių struktūros ir funkcijos defektai, paveikiantys mukociliarinį klirensą ir spermatozoidų žiuželių funkciją. Sutrikęs sekreto pašalinimas iš plaučių, sinusų ir vidurinės ausies lemia dažnas kvėpavimo takų infekcijas. Kartagenerio sindromas yra pirminės ciliarinės diskinezijos tipas, asocijuotas su atvirkštine organų padėtimi ir bronhektazėmis (21). Vyrams PCD gali sukelti reprodukcinį sutrikimą, įskaitant sumažėjusį spermatozoidų judrumą, nenormalią spermatozoidų morfologiją ir sumažėjusį spermatozoidų skaičių, o tai gali lemti vyrų nevaisingumą (22).

Įgimtas hipogonadotropinis hipogonadizmas yra reta būklė (1: 30 000 - 86 000 vyrų), pasireiškianti gonadotropiną atpalaiduojančio hormono (GnRH) sekrecijos nepakankamumu, dėl kurio vėluoja lytinis brendimas ir atsiranda nevaisingumas. Liga gali būti susijusi su įvairiomis kitomis anomalijomis, o hipogonadotropinio hipogonadizmo ir uoslės nebuvimo simptomų derinys vadinamas Kallmanno sindromu. Suaugusiems asmenims būdingi hipogonadizmo požymiai: mažas sėklidžių tūris, antrinių lytinių požymių nebuvimas, mažesnė raumenų masė, erektilinė disfunkcija, nevaisingumas (19).

Tikslios genetinės vyro nevaisingumo priežasties nustatymas turi reikšmės klinikinėje praktikoje. Kai kuriais atvejais galima išvengti nereikalingų intervencijų (pvz.: spermos ekstrakcijos iš sėklidės (TESA) procedūra nerekomenduojama, kai randamos *AZF<sub>a</sub>* ir *AZF<sub>b</sub>* delecijos, nes tikimybė rasti spermatozoidų beveik lygi nuliui. Tuo tarpu vyrams, turintiems *AZF<sub>c</sub>* mikroleciją, vidutiniškai yra apie 50 % sėkmingos TESA procedūros tikimybė (17)). Nustačius genetinę ligą, įvertinamos genetinės ligos simptomai ir požymiai, paskiriamas tinkamas stebėsenos ir gydymo planas. Kai kuriais atvejais galima prevencija (pvz., pacientams su Klinefelterio sindromu skiriant ankstyvą gydymą testosteronu, galima išvengti mikrofalo bei tam tikrų kognityvinių ir elgesio sunkumų (14); laiku diagnozavus ir pradėjus įgimto hipogonadotropinio hipogonadizmo gydymą prasideda lytinis brendimas, pagerėja lytinė ir



psichologinė sveikata, medžiagų apykaita (19)). Pagal ligos paveldėjimo būdą įvertinama genetinė rizika giminaičiams (pvz., *AZF* mikrodelecijos visuomet perduodamos vyriškos lyties palikuonims (23)), jei reikia, atliekami segregacijos tyrimai šeimoje.

Šiuo metu taikant tradicinę diagnostiką genetinė diagnozė nustatoma maždaug 4 % nevaisingų vyrų, nors manoma, kad genetiniai defektai turėtų būti nustatyti apie 15 % vyrų nevaisingumo atvejų (1). Platesnes galimas genetinės diagnostikos apimtis rodo gausus genų, kurių raiška vyksta sėklidėse, skaičius ir gyvūnų modeliai. Nustatyta 2300 genų raiška žmogaus sėklidėse (1), jų mutacijos potencialiai galėtų paveikti sėklidžių veiklą; su pelių patinų nevaisingumu jau susieta bent 600 genų (1). Šie netiesioginiai duomenys rodo, jog šiuo metu vyrų nevaisingumo genetinė diagnostika gali būti nepakankama.

Be to, genetinių nevaisingumo priežasčių ištyrimas nėra standartizuotas (5). Įvairiuose tyrimuose tyrėjai pritaiko skirtingus genų skaičius ir sudėti diagnostinius genų rinkinius. Esant neobstrukcinei azoospermijai, autoriai Krausz ir Riera-Escamilla be minėtų EAU tyrimų, siūlo tirti *TEX11* geną (24), kurio mutacijos nustatomos 2,5% vyrų su NOA, tuo tarpu Tüttelmann ir kt. rekomenduoja įtraukti ir genus *NR5A1*, *DMRT1*, teigdami, jog tai padidintų diagnostikos efektyvumą iki 25% procentų (25). Nustačius globozoospermiją (teratozoospermijos forma), Krausz ir Riera-Escamilla rekomenduoja tirti *DPY19L2* geną (24), šio geno mutacija randama 70% globozoospermijos atvejų. Tuo tarpu Ellnati ir kt. siūlo ieškoti mutacijų ne tik *DPY19L2*, bet ir *SPATA16* gene, nes diagnostikos veiksmingumas padidėtų dar 2% (26). Kuo daugiau su liga siejamų genų tiriama, tuo didesnė tikimybė nustatyti diagnozę. Neturint standartizuotų tyrimo strategijų, kyla nepakankamos diagnostikos ir didelio idiopatinų atvejų skaičiaus problema (5).

Kita vertus, svarbi ir klaidingos diagnozės bei neteisingų genų ir ligų sąsajų nustatymo problema: manoma, kad iki 10% genų bei jų variantų patogeniškumo vertinimas ir sąsajos su ligomis nustatymas medicininėje literatūroje ir genetinių duomenų bazėse yra klaidingi (27). Todėl labai svarbu validuoti geno sąsają su fenotipu, taikant griežtus, standartizuotus kriterijus (28). Su nevaisingumu siejamų genų – kandidatų sąrašas auga eksponentine progresija ir 2018 m. jau buvo nustatyta daugiau naujų genų ir ligų sąsajų nei 2015, 2016 ir 2017 m. kartu sudėjus. Tačiau patikimai susietų genų ir ligos sąsajų skaičius yra mažesnis (1). Patikimai sąsajai įrodyti reikalingi biologiniai įrodymai, patvirtinantys numanomą ryšį su vyrų nevaisingumu (pvz., gyvūnų modeliai), rezultatas pakartotas nepriklausomu tyrimu žmonių populiacijose ir funkciniai

įrodymai, kad nustatyti variantai yra patogeniniai (25). Šiuo metu dauguma aprašytų genų mutacijų nustatytos tik pavieniams pacientams ir trūksta funkcinių įrodymų. Klaidingai nustatytas geno ir ligos ryšys gali lemti netinkamą diagnozę ir netinkamą nevaisingų porų konsultavimą bei gydymą (1).

Tarptautinis vyrų nevaisingumo genomikos konsorciumas išskėlęs tikslą, kad per ateinančią dešimtmetį vyrų nevaisingumo genetinės diagnostikos veiksmingumas padidėtų nuo dabartinių 4% iki > 10% visų vyrų nevaisingumo atvejų (1). Keliami uždaviniai - identifikuoti genus kandidatus ir juos validuoti, sudaryti žinomų genų kandidatų sąrašą ir įvertinti, kokiai daliai nevaisingų vyrų populiacijos yra nustatoma genetinė diagnozė, atliekant genų kandidatų ir (ar) viso egzomo/genomo sekoskaitą.

**Šio darbo tikslas:** išanalizuoti *SPAG1* ir *KISS1* genų sąsajas su vyrų nevaisingumu, nagrinėjant klinikinius atvejus ir atliekant literatūros analizę.

#### **Uždaviniai:**

1. Apžvelgti medicininę literatūrą apie vyrų nevaisingumo genetiką.
2. Išanalizuoti du klinikinius atvejus;
3. Įvertinti molekulinis patogeninius *SPAG1* ir *KISS1* mutacijų mechanizmus bei sąsajas su vyrų nevaisingumu.

**Metodai:** gavus informuotus sutikimus, išanalizuoti dviejų pacientų, kuriems VULSK Medicininės genetikos centre diagnozuotas monogeninės kilmės vyrų nevaisingumas, klinikiniai, laboratorinių, instrumentinių, genetinių tyrimų duomenys. Literatūros paieška atlikta OMIM, PubMed duomenų bazėse bei Europos Andrologų Asociacijos ir Tarptautinio Vyrų Nevaisingumo Genomikos Konsorciumo tinklapiuose.

## **KLINIKINIŲ ATVEJŲ APRAŠYMAS**

### **I ATVEJIS**

28-erių metų vyras hospitalizuotas dėl kasdien atkosėjamo sekreto bei pasikartojančių pneumonijų nuo trejų metų amžiaus. Apžiūros metu matoma laikrodžio stikliuko rankų nagų deformacija, suponuojanti lėtinę hipoksiją organizme. Atlikta krūtinės ląstos kompiuterinė tomografija (KT), kurioje matoma kairiojo plaučio liežuvinėje skiltyje cistinės bronhektazės,

dešiniojo plaučio viršutinės skilties S3 bronchiolito vaizdas, abiejų plaučių apatinėse skiltyse bronchų spindžiai tolygiai praplėsti iki periferijos bei dekstrokardija. Tuomet, atlikus fibroskopiją, stebėta deformuoti bronchai dėl lėtinio uždegimo, pūlingas sekretas bilateraliai, dešinėje pusėje kairio plaučio bronchų anatominis išsidėstymas, o kairėje pusėje dešinio plaučio bronchų anatominis išsidėstymas. Taigi, instrumentiniai tyrimai rodo bronhektazes abiejuose plaučiuose, lėtinį uždegimą ir atvirkštinę organų padėtį - *situs inversus*.

Pacientas nukreiptas gydytojo genetiko konsultacijai, įtariant genetinį sindromą. Pagal anamnezės duomenis gimė, augo ir vystėsi normaliai, genealogija neinformatyvi. Nusiskundimai: uoslės sutrikimas. Klinikinės apžiūros metu mikroanomalijų nestebima. Pagal klinikinius požymius diagnozuotas Kartagenerio sindromas (kuriam būdinga *situs inversus*, pasikartojančios kvėpavimo takų infekcijos ir bronhektazės), paskirtas genų rinkinio tyrimas naujos kartos sekoskaitos (NKS) metodu, tiriant *DNAI1*, *DNAI2*, *DNAH5*, *DNAH11* ir kitus su Kartagenerio sindromu siejamus genus. Patogeninių ir tikėtina patogeninių pokyčių šiuose genuose nenustatyta. Nustatoma klinikinė diagnozė: Kartagener sindromas. Rekomenduotos pulmonologo konsultacijos ir vaisingumo specialisto konsultacija esant indikacijoms, nes vienas iš Kartagener sindromo požymių – nevaisingumas.

Po trejų metų pacientas kreipėsi dėl 1,5 metų nesėkmingo bandymo susilaukti vaikų, diagnozuotas nevaisingumas. Nevaisingumo rizikos veiksnius, tokius kaip lytiškai plintančios ligos, kriptorchizmas, urologinės operacijos, sėklidžių uždegimas, vaistų vartojimas, bei žalingus įpročius (rūkymą, piknaudžiavimą alkoholiu) pacientas neigė. Apžiūrint - išoriniai lytiniai organai be matomų pokyčių, čiuopiant - sėklidės, sėkliniai latakai palpuojami abipus. Atlikta sėklidžių echoskopija, rasta dešinėsios sėklidės varikocelė (kiek prasiplėtusios dangalų venos iki 3 mm, pasistandinimo mėginys Duplex režimu teigiamas) ir kalcinatas (6x8 mm) centrinėje prostatos dalyje. Vyro spermogramoje nustatyta oligoastenospermija, nepakankama spermatozoidų koncentracija – 2 mln/ml (norma yra 15 mln/ml), progresyviai judrių spermijų nerasta (A+B = 0 %) (normos atveju A+B>32%) , visi spermijai D tipo (nejudrūs). Atlikus laboratorinius tyrimus rasta sumažėjusi testosterono koncentracija: 6,68 nmol/l (norma 21 - 49 m. vyrui 8,33 - 30,19 nmol/l); liuteinizuojančio hormono ir folikulus stimuliuojančio hormono koncentracijos normos ribose - nustatyta klinikinė hipogonadotropinio hipogonadizmo diagnozė. Atlikta galvos smegenų magnetinio rezonanso tomografija (MRT) dėl galimų hipofizės ar pogumburio darinių, jų neaptikta. Skirtas gydymas chorioniniu gonadotropinu 150 mikrogramų 2

kartus per savaitę spermatogenezei skatinti. Rekomenduota atlikti spermogramą po trijų mėnesių, išliekant oligospermijai pridėti injekcinį tirpalą Filitropini alfa.

Po pakartotinės genetiko konsultacijos, paskirtas viso egzomo sekoskaitos tyrimas. Nustatytas *SPAG1* geno 16 egzono heterozigotinio genotipo neaprašytas, tikėtina patogeninis NM\_003114.5:c.2104delA (NP\_003105.2 :p.(Gly703Aspfs\*9)) variantas, sukiantis rėmelio poslinkį ir priešlaikinio baigmės kodono susidarymą, ir viso 2 egzono heterozigotinio genotipo delecija. Galimas sudėtinis heterozigotinis nustatytų *SPAG1* variantų genotipas galėtų būti tiriamojo klinikinių požymių (Kartagener sindromo klinikiniai požymiai, bronhektazės, oligoastenospermija) priežastimi. Patogeniniai pokyčiai *SPAG1* gene lemia autosominiu recesyviu būdu paveldimą 28 tipo nejudrių žiuželių Kartagenerio sindromą (ORPHA:244, MIM# 615505).

## II ATVEJIS

28-erių metų vyras hospitalizuotas dėl dešinės sėklidės hipotrofijos, bendro silpnumo, svorio augimo, riebalų kaupimosi klubuose. Sėklidės hipotrofija stebima nuo vaikystės, patvirtinta echoskopiskai. Apžiūros metu matoma riebalų kaupimasis klubuose, rausvos strijos, antsvoris (KMI - 29 kg/m<sup>2</sup>), aukštas ūgis (194 cm). Palpuojant skydliaukę nepadidėjusi, be mazgų. Nustatyta klinikinė hipogonadotropinio hipogonadizmo diagnozė: sumažėjusi TTE koncentracija (7,28 mmol/l), LH ir FSH normos ribose. Paskirtas testosterono 1000 mg/ 4 ml injekcinis tirpalas 4 ml kartą per tris mėnesius.

Prolaktino koncentracija normos ribose - paneigta prolaktinoma; galvos smegenų MRT eksliuduota hipofizės patologija ar pogumburio navikas. Adrenokortikotropinio hormono stimuliacijos mėginys neigimas (su 250mg sinakteno kortizolio išstimuliuo iki 581 nmol/l), atmetas antinksčių nepakankamumas. MRT rastas atsitiktinis radinys - kairėje frontalinėje srityje baltojoje medžiagoje nedidelė kavernoma su buvusiu lokaliu pakraujavimu ir asocijuota venine angioma, dėl šios priežasties rekomenduota kartotinai atlikti MRT po 6-8 mėnesių. Kartotinėje MRT vaizdas dinamikoje nesikeičia - hipofizė be židinių pakitimų; kavernoma asocijuota su venine angioma be esminės dydžio dinamikos.

Vyras nukreiptas gydytojo genetiko konsultacijai. Remiantis anamnezės duomenimis, gimė, augo ir vystėsi normaliai. Lytinis brendimas pagal amžių. Mokslai sekėsi gerai, turėjo bendravimo problemų. Atlikus klinikinę apžiūrą, mikroanomalijų nestebima. Kariotipo tyrime –

46,XY, chromosomų skaičiaus ir struktūros pakitimų nenustatyta. Atliktas naujos kartos sekoskaitos tyrimas, tiriant su hipogonadotropiniu hipogonadizmu susijusių genų rinkinį. Ištyrus *KISS1* geno 2 egzono koduojančios sekos dalį, nustatytas neaiškios klinikinės reikšmės c.58G>A variantas homozigotinėje būklėje (rs12998), keičiantis koduojamą aminorūgštį (NP\_002247.3:p.(Glu20Lys)). Variantai šiame gene lemia autosominiu recesyviu būdu paveldimą hipogonadotropinį hipogonadizmą, 13 tipo su arba be anosmijos (MIM#614842, ORPHA:432). Diagnozuotas 13 tipo hipogonadotropinis hipogonadizmas.

## APTARIMAS

Po diagnostinio tyrimo, rekomenduojamo EUA, apie 40% vyrų, kurių spermatogenezė sutrikusi, etiologija taip ir lieka neaiški (3), tokie atvejai priskiriami idiopatiniam nevaisingumui. Kadangi tūkstančiai genų prisideda prie lytinių ląstelių vystymosi, sėklidžių funkcijos ir spermatogenezės proceso (19), manoma, kad didelę dalį idiopatinių atvejų lemia monogeninės ligos (28), o dabartinė genetinė diagnostika yra nepakankama.

Norint nustatyti patologiją, reikalingas tinkamas genetinis ištyrimas. Šiuo metu EAU gairėse rekomenduojamas genetinis ištyrimas apsiriboja kariotipo tyrimu, azoospermijos faktoriaus (*AZF*) delecijų vertinimu ir cistinės fibrozės transmembraninio laidumo regulatoriaus (*CFTR*) geno tyrimu (9), o kai kuriose šalyse vis dar įprastai nenaudojami net ir šie tyrimai (5). Kitais atvejais gali būti skiriamas labai įvairus, nestandardizuotas genetinis ištyrimas, pavyzdžiui, sudaromi skirtingi genų skaičiumi ir sudėtimi genų rinkiniai (1,24). Nenustačius patologijos genų rinkinio tyrimo, gali būti skiriamas viso egzomo ar viso genomo sekoskaitos tyrimas, juo galima nustatyti retus ar naujus mutacijų variantus, kurie lieka nepastebėti taikant kitus metodus (28).

Plačiai paplitus naujos kartos sekoskaitos metodui, atrandama vis daugiau monogeninių vyrų nevaisingumo priežasčių (21). Vyksta spartus su vyrų nevaisingumu susijusių genų atradimas: nuo 2019 iki 2021 metų žmogaus vyrų nevaisingumo genų sąrašas prasiplėtė 33 procentais. Šiuo metu iš viso nustatyta bent 120 genų, kurie yra vidutiniškai, stipriai arba neabejotinai patikimai susiję su 104 nevaisingumo fenotipais (5).

Daugėjant atrandamų genų, jie aprašomi skirtinguose straipsniuose, todėl sunku parinkti konkretų genų rinkinį, neatsilikti nuo naujausių mokslinių tyrimų rezultatų. Skirtingi autoriai siūlo skirtingus genų skaičiumi ir sudėtimi genų rinkinius, pvz: hipogonadotropinio

hipogonadizmo atveju rekomenduojama tirti nuo 25 iki 32 genų (24,29). Idealiu atveju turėtų būti parengtos standartizuotos klinikinio ir genetinio ištyrimo rekomendacijos (19). Kadangi atliekant viso egzomo sekoskaitos tyrimus susiduriama su atsitiktinių genetinių radinių problema, didelė neaiškios klinikinės reikšmės variantų nustatymo tikimybė, paprastai pradžioje rekomenduojama atlikti genų rinkinių tyrimus naujos kartos sekoskaitos metodu. Standartizuoto genų rinkinio sukūrimas ir nuolatinis peržiūrėjimas padėtų klinikinėje praktikoje tobulinti žinias apie nevaisingumo priežastis ir pritaikyti gautus duomenis įprastinei diagnostikai (19).

Be to, genetinių variantų patogeniškumas ne visada įvertinamas tinkamai, todėl kyla netinkamai nustatytos geno ir ligos sąsajos, hiperdiagnostikos ar klaidingos diagnozės nustatymo problemos (1). Patogeniniai genų variantai turi skirtingą fenotipinį poveikį reprodukciniam ir nereprodukciniam organams, kurį gali lemti ir kiti genetiniai ar negenetiniai veiksniai (19). Todėl prieš įtraukiant geną į su nevaisingumu susijusių genų sąrašą būtinas validavimas (28).

Šiame darbe bus išsamiai aptartos *SPAG1* ir *KISS1* genų mutacijų sąsajos su nevaisingumu, įvertinant aprašytus kliniskus atvejus bei genotipo – fenotipo koreliaciją, įrodymus funkcinio ir gyvūnų modelių lygmenimis. *SPAG1* dar nėra įtrauktas į su vyrų nevaisingumu siejamų genų sąrašą.

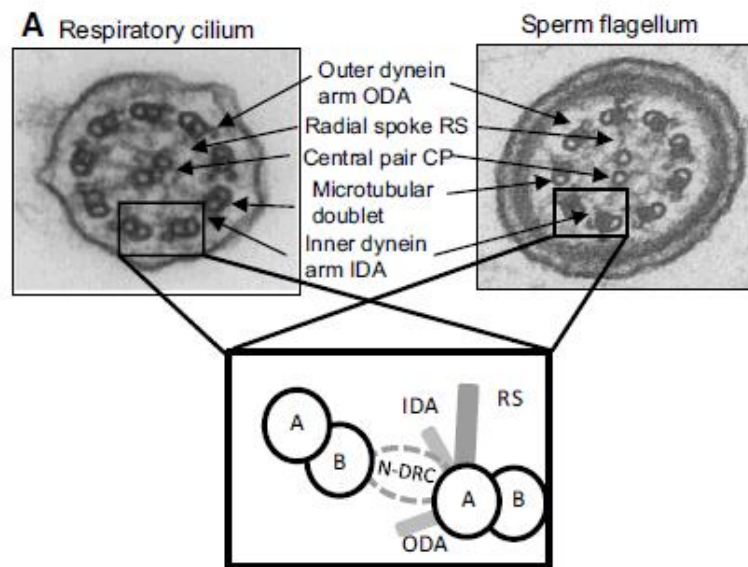
## **SPAG1 (SU SPERMA SUSIJUSIO ANTIGENO-1) GENO SĄSAJOS SU VYRŲ NEVAISINGUMU**

*SPAG1 (su sperma susijęs antigenas-1)* - tai baltymą koduojantis genas 8q22.2 geno srityje. Stipriausia geno raiška žmogaus organizme yra plaučiuose, smegenyse, storjoje žarnoje, inkstuose ir sėklidėse (30). Šis baltymas dalyvauja, surenkant vidines (IDA, angl. *inner dynein arms*) ir išorines (ODA, angl. *outer dynein arms*) dineino šakas, kurios reikalingos normaliam judrių blakstienėlių funkcionavimui (31). Žmogaus organizme blakstienėlės svarbios tam tikrų audinių, įskaitant sėklides, inkstus ar plaučius, funkcijai, o jų funkcijos sutrikimai lemia įvairias patologijas, iš kurių pagrindinės yra nevaisingumas, inkstų policistozė ir PCD.

*SPAG1* priklauso dineino aksoneminio surinkimo faktorių (DNAAF, angl. *dynein axonemal assembly factor*) baltymų šeimai (32), o DNAAF - tai baltyminiai faktoriai, reikalingi dineino šakų surinkimui. *SPAG1* jungiasi su DNAAF2, multimerizuojasi ir sudaro karkasą blakstienėlės baltymų, įskaitant dineiną, surinkimui (32). Motoriniai baltymai reikalingi blakstienėlių judrumui, o blakstienėlių judrumas reikalingas svarbioms vystymosi ir fiziologinėms funkcijoms,

susijusioms su skysčių judėjimu (pvz., kvėpavimo takų blakstienėlės vykdo mukociliarinį klirensą, embrioninio mazgo blakstienėlės svarbios, nustatant kairės ir dešinės kūno pusės asimetriją) arba judėjimu per skystį (pvz., spermatozoidų žiuželiai) (33).

Blakstienėlės yra neatsiejama spermatozoidų žiuželių, kurie turi 9+2 (devynios periferinės ir dvi centrinės) mikrovamzdelių porų struktūras, dalis. Šios struktūros sujungtos neksino jungtimi, dineino šakomis ir spindulių forma išsidėsčiusiais stipiniais (1 Pav.). Blakstienėlių disfunkcija sukelia spermatozoidų žiuželių sutrikimus (22).



**1 paveikslas.** Kvėpuojamųjų blakstienėlių (kairėje) ir spermos žiuželių (dešinėje) struktūra (34).

*SPAG1* geno mutacijos susijusios su pirmine ciliarine diskinezija (30) - genetiniu sutrikimu, kuriam būdingi blakstienėlių struktūros ir funkcijos defektai, pasireiškiantys lėtinėmis pasikartojančiomis kvėpavimo takų infekcijomis. Patogeniniai *SPAG1* variantai taip pat yra susieti su Kartagenerio sindromu, kuriam būdingas pirminės ciliarinės diskinezijos ir *situs inversus* derinys (35).

Atlikus literatūros analizę, nustatyta, jog nuo 2013 m. mokslinėje literatūroje aprašyti tik 27 asmenys sergantys PCD ir turintys *SPAG1* geno mutacijų (30,32,36–38). Išnagrinėti aprašytų pacientų genotipo ir fenotipo duomenys, klinikinių simptomų ir požymių spektras (1 lentelė). Visiems pacientams pasireiškė kvėpavimo takų ligos ar vidurinės ausies uždegimai, 69% pacientų organų padėtis atvirkštinė (*situs inversus*), tačiau nevaisingumas, kaip stebimas

požymis, dar neaprašytas. 24 iš 25 pacientų nustatytas (vienas pacientas tirtas iki vienerių metų amžiaus, todėl ultrastruktūrinis blakstienėlių defektas galėjo būti įvertintas klaidingai) išorinių ir vidinių dineino šakų defektai, siejami su judrių blakstienėlių disfunkcija.

**1 lentelė.** Pacientų, sergančių pirmine ciliarine diskinezija, fenotipinio spektro apžvalga (30,32,36–38).

Paciento nr. / šaltinis	Mutacija	Lytis	Amžius (metais)	Organų padėtis	Ultrastruktūriniai blakstienėlių defektai	Etninė priklausomybė	Sinusitas	Vidurinės ausies uždegimas	Kita
1. / [Knowles et al. 2013]	c.679G>T	M	17	SS	ODA+IDA	Baltasis	Taip	Taip	
2. / [Knowles et al. 2013]	c.902_906delAAGTA	M	4 mėn	SI	ODA+IDA	Baltasis	Taip	Taip	
3. / [Knowles et al. 2013]	c.2014C>T	V	35	SI	ODA+IDA	Baltasis	Taip	Ne	
4. / [Knowles et al. 2013]	c.2014C>T	V	14	SI	ODA+IDA	NA	Taip	Taip	
5. / [Knowles et al. 2013]	c.2014C>T	V	5	SI	ODA+IDA	Baltasis	Taip	Taip	
6. / [Knowles et al. 2013]	c.2542delG	V	14	SI	ODA+IDA	Pietų azijos kiln	Ne	Ne	
7. / [Knowles et al. 2013]	c.2542delG	V	2	SI	ODA+IDA	Pietų azijos kiln	Ne	Taip	
8. / [Knowles et al. 2013]	c.2T>G	V	12	SS	ODA+IDA	Baltasis	Taip	Taip	
9. / [Knowles et al. 2013]	c.2T>G	V	10	SI	ODA+IDA	Baltasis	Taip	Taip	
10. / [Knowles et al. 2013]	c.2T>G	M	8	SS	ODA+IDA	Baltasis	Taip	Taip	
11. / [Knowles et al. 2013]	c.2014C>T	V	19	SS	ODA+IDA	Baltasis	Taip	NA	
12. / [Knowles et al. 2013]	c.2014C>T	V	22	SI	ODA+IDA	Baltasis	Taip	Taip	
13. / [Knowles et al. 2013]	c.2089C>T	M	16	SI	NA	Baltasis	Taip	Taip	
14. / [Knowles et al. 2013]	c.1993_1996delCTCT	M	12	SS	ODA+IDA	Baltasis	Taip	Taip	
15. / [Chen et al. 2017]	del8q22.2-q23.3*	M	17	gestacir	NA	NA	NA	NA	IUGR; bilateralinis lūpos ir gomurio nesuaugimas
16. / [Guo et al. 2020]	NM_172218: c.1649_1650insA; NM_172218: c.691delT	M	13	SI	ODA+IDA	Pietų azijos kiln	Taip	Taip	Bronchektazės; skoliozė, chroninis kosulys
17. / [Djakow et al. 2015]	c.[2014C>T]; [61+201_POLR2K: c.140+1169_SPAG1del]	V	12	SS	ODA+IDA	NA	Taip	NA	Pneumonija
18. / [Djakow et al. 2015]	c.[2014C>T]; [61+201_POLR2K: c.140+1169_SPAG1del]	V	1	SI	ODA+IDA	NA	Ne	Taip	
19. / [Djakow et al. 2015]	c.[2014C>T]; [61+201_POLR2K: c.140+1169_SPAG1del]	M	0	SS	ODA	NA	Ne	Taip	
20. / [Djakow et al. 2015]	c.[2014C>T]; [2014C>T]	M	11	SS	ODA+IDA	NA	Taip	Ne	Pneumonija
21. / [Djakow et al. 2015]	c.[2014C>T]; [2014C>T]	M	14	SI	ODA+IDA	NA	Taip	NA	
22. / [Djakow et al. 2015]	c.[2014C>T]; [2014C>T]	M	5	SI	ODA+IDA	NA	Taip	Taip	Pneumonija
23. / [Djakow et al. 2015]	c.[2014C>T]; [2014C>T]	M	5	SI	ODA+IDA	NA	Taip	NA	
24. / [Djakow et al. 2015]	c.[2014C>T]; [2014C>T]	V	12	SI	ODA+IDA	NA	Taip	Taip	Pneumonija
25. / [Djakow et al. 2015]	c.[2014C>T]; [61+201_POLR2K: c.140+1169_SPAG1del]	M	11	SI	ODA+IDA	NA	Ne	Ne	Pneumonija
26. / [Djakow et al. 2015]	c.[2014C>T]; [61+201_POLR2K: c.140+1169_SPAG1del]	V	26	SS	ODA+IDA	NA	Taip	Taip	Pneumonija
27. / [Davis et al. 2015]	NA**	V	5	SI	ODA+IDA	NA	NA	NA	Chroninis kosulys

\* atliktas molekulinio kariotipavimo tyrimas, delecija apima keletą genų: *SPAG1*, *GRHL2*; *NCALD*; *RRM2B*; *ZFPM2*; \*\*mutacija nedetalizuota. SS - *situs solitus* arba įprastinė organų padėtis; SI - *situs inversus* arba atvirkštinė organų padėtis; ODA - išorinės dineino šakos; IDA - vidinės dineino šakos; M - moterys; V - vyrai; IUGR - intrauterininis vaisiaus augimo sulėtėjimas, NA – duomenys nepateikti.

Knowles ir kt. išsamiai aprašė keturiolika asmenų, turinčių patogeninius *SPAG1* geno variantus. Nustatyti PCD fenotipiniai požymiai: *situs inversus* (8 pacientams), naujagimio kvėpavimo distreso sindromas, vidinės ausies uždegimas, bronchektazės ir sinusitas. Išorinių ir



vidinių dineino šakų defektai (ODA+IDA) nustatyti visiems pacientams (30). Kitame straipsnyje analizuoti jaunų pacientų, sergančių PCD, duomenys. Aštuoniems nustatyti patogeniniai *SPAG1* geno variantai, klinikinis pasireiškimas buvo *situs inversus* (6 pacientai), pasikartojančios apatinių kvėpavimo takų infekcijos, rinorėja, kasdieninis šlapias kosulys, sinusitas, vidurinės ausies uždegimas ir pneumonija. Pacientams nustatyti nejudrios blakstienėlės (8/9 pacientų) ir kombinuoti ODA+IDA defektai (9/10 pacientų) (36). PCD, *situs inversus*, nuolatinis kosulys ir ODA+IDA defektas buvo užfiksuoti dar dviems vaikams (37,38).

Išanalizuoti duomenys rodo, jog patogeniniai *SPAG1* geno variantai sukelia ir išorinių, ir vidinių dineino šakų defektus (ODA+IDA). Kadangi pastebėta, kad PCD sergantys asmenys, turintys kombinuotus ODA+IDA defektus arba tik IDA defektą su pakitusia mikrovamzdelių struktūra kvėpavimo blakstienėlėse, yra dažniau nevaisingi nei PCD sergantys asmenys, kurių kvėpavimo blakstienėlių defektai yra kitokie, pavyzdžiui, izoliuotas ODA defektas (22), galima daryti prielaidą, kad *SPAG1* geno defektai gali būti susiję su vyrų nevaisingumu.

*SPAG1* reikšmę vyrų nevaisingumui patvirtina ir kiti įrodymai. Nevaisingos moters serume buvo nustatyti antikūnai prieš SPAG1. Ištirta, kad šie antikūnai pasižymi stipriu spermatozoidus agliutinuojančiu aktyvumu, jie buvo įvardyti kaip galima nepaaiškinamo nevaisingumo priežastis (39). *In-situ* hibridizacija atskleidė, kad *SPAG1* geno raiška vyksta visose žmogaus lytinėse ląstelėse kiekviename spermatogenezės etape. Signalas stipriausias spermatogonijose ir palaipsniui silpnėja, vykstant lytinių ląstelių diferenciacijai (40).

*SPAG1* vaidmuo spermatogenezei buvo tiriamas ir panaudojant gyvūnų modelius. Vienas iš tokių modelių - vaisinė muselė *Drosophila melanogaster*, artimiausias žmogaus *SPAG1* genui muselės homologas yra *CG18472*. Zur Lage ir kt. tyrime (2018m.) *CG18472* delecija sukėlė visišką patinėlių nevaisingumą dėl subrendusių, tačiau nejudrių spermatozoidų, tai rodo, kad šis genas yra būtinas patinėlių vaisingumui (41). Kitas gyvūnas, naudotas *Spag1* geno tyrimams, yra vaivorykštinis darteris *Etheostoma caeruleum*. Tiriant šias žuvis, Bahamonde ir kt. (2016m.) nustatė stiprią *Spag1* raišką *Etheostoma caeruleum* sėklidžių vystymosi, brendimo metu, prieš nerštą ir neršto metu (42). Tai leidžia manyti, kad *Spag1* raiška padidėja reprodukcinio laikotarpiu. Įžvalgų gauta ir atlikus tyrimus su šernais. Hu ir kiti (2017) nustatė, jog mikroRNR-638 reguliuoja nesubrendusių Sertoli ląstelių augimą ir apoptozę, veikdama *Spag1* geną, kuris gali netiesiogiai inaktyvuoti fosfatidilinozitolio 3-kinazės/baltymų kinazės B kelią (43). Be to, nustatyta, kad *Spag1* reikalingas verpstės morfogenezei ir spermatogonijų proliferacijai (43).

Visi šie tyrimai rodo, kad *SPAG1* yra svarbus normaliam žinduolių ir kitų gyvūnų sėklidžių vystymuisi bei reprodukciniams funkcijoms. Tikslūs mechanizmai, kuriais *SPAG1* reguliuoja spermatogenezę, dar nėra iki galo išaiškinti, reikalingi išsamesni tyrimai.

Surinkti duomenys rodo, kad nevaisingumas – tikėtinas 28 tipo nejudrių žiuželių sindromo dėl *SPAG1* geno patogeninių variantų klinikinis simptomas. Šio geno validavimui trūksta didesnio kiekio aprašytų pacientų su patogeninėmis *SPAG1* geno mutacijomis literatūroje ar duomenų bazėse. Įtraukiant nevaisingumą, kaip galimą *SPAG1* mutacijų pasekmę, praplečiamas 28 tipo nejudrių žiuželių sindromo klinikinių požymių pasireiškimo spektras.

### ***KISS1* (KISS - 1 METASTAZIŲ SUPRESIJOS) GENO SAŠAJOS SU VYRŲ NEVAISINGUMU**

*KISS1* – tai baltymus kisleptinus koduojantis genas 1q32.1 genomo srityje. Šis genas yra metastazes slopinantis genas, kuris slopina melanomų ir krūties karcinomų metastazes, be to, baltyminis produktas kisleptinas atlieka svarbų vaidmenį, reguliuojant reprodukcinę funkciją (44).

Kisleptinai (Kp54, Kp14, Kp13, Kp10), sintetinami pagumburio arkiniam branduolyje bei anteroventraliniame paraventrikuliniame branduolyje (45), veikia pagumburio-hipofizės-gonadų ašį ir steroidogenezę (46). Jie skatina gonadotropiną atpalaiduojančio hormono išsiskyrimą, kuris savo ruožtu stimuliuoja liuteinizuojančio hormono ir folikulus stimuliuojančio hormono gamybą ir išsiskyrimą iš hipofizės. LH sukelia intersticinių Leydigo ląstelių, kurios išskiria testosteroną, proliferaciją ir brendimą. FSH veikia sėklinių kanalėlių Sertolio ląsteles, skatindamas spermatogenezę reikalingų signalinių molekulių ir metabolitų gamybą. Kartu su TTE ir FSH, Sertoli ląstelės netiesiogiai skatina sėklinių kanalėlių lytinių ląstelių proliferaciją ir brendimą, iš kurių subrendę spermatozoidai išsiskiria į sėklinių kanalėlių skystį ir transportuojami į sėklidės prielipą, kur galutinai subręsta ir yra kaupiami (47). Taigi, kisleptinai reguliuoja GnRH sekreciją, padidina testosterono produkciją (46).

Kisleptinų raiška taip pat vyksta sėklidėse ir spermatozoiduose. *KISS1* yra subrendusiuose žmogaus spermatozoiduose ir gali sukelti lėtą ir ilgalaikį viduląstelinės  $Ca^{2+}$  koncentracijos padidėjimą spermatozoiduose, kuris siejamas su spermatozoidų judrumu, aktyvumu ir akrosomine reakcija. (46)

*KISS1* geno mutacijos siejamos su įvairiais reprodukciniais sutrikimais. *KISS1* geno funkcijos praradimo mutacijos sukelia hipogonadotropinį hipogonadizmą, o funkcijos įgijimo mutacijos - ankstyvą lytinį brendimą (48). OMIM duomenų bazėje aprašoma, jog žmonėms, turintiems *KISS1* funkcijos praradimo mutaciją, būdingas 13 tipo hipogonadotropinis hipogonadizmas su anosmija arba be jos, paveldimas autosominiu recesyviniu būdu; ligos pasireiškimo dažnis nežinomas (49).

Atlikus *Human Phenotype Ontology* duomenų bazėje aprašytų pacientų su *KISS1* geno mutacijomis analizę (n=152), matoma jog geno patogeniniai variantai siejami su 85 fenotipiniais požymiais (50). Požymius galima skirstyti į grupes: endokrinologiniai – reprodukciniai; veido mikroanomalijos; raumenų ir skeleto patologijos; klausos sutrikimai; psichiatriniai simptomai. Iš 85 išvardytų požymių 49 yra endokrinologiniai-reprodukciniai sutrikimai - sumažėjusi gonadotropino koncentracija, sumažėjusi FSH arba LH hormono koncentracija, sumažėjusi androgenų koncentracija ar sumažėjęs estradiolio kiekis serume. Gali būti sutrikęs lytinis brendimas, moterims nustatoma sutrikusi kiaušidžių morfologija ir fiziologija, nenormali krūtų morfologija, gimdos hipoplazija, sutrikęs menstruacinis ciklas, amenorėja; vyrams - kriptorchizmas, sėklidžių aplazija, patologinė sėklidžių ar varpos morfologija, mikrofalas, neobstrukcinė azoospermija, ginekomastija. Abiems lytims vėluoja lytinis brendimas, gali neišsivystyti antriniai lytiniai požymiai. Raumenų ir skeleto patologija nustatyta 25,9 % pacientų: sąnarių kontraktūros, augimo sulėtėjimas, skeleto brendimo sulėtėjimas, kaulų mineralų tankio anomalijos (osteoporozė ar osteopenija), kaulų struktūros anomalijos ir kiti raumenų ir skeleto pakitimai. 8,2 % pacientų nustatytos veido mikroanomalijos: hipertelorizmas, gomurio nesuaugimas, dantų, nosies morfologijos pokyčiai. 2,4 % atvejų nustatyti klausos sutrikimai: neurosensorinis prikurtimas, funkciniai vidinės ausies sutrikimai. Iš psichiatrinų simptomų minima depresija ir nerimo sutrikimai. Didžiąjai daliai pacientų su *KISS1* geno mutacijomis pasireiškia lytinės sistemos patologija, tačiau fenotipinis požymių spektras įvairus.

*KISS1* vaidmuo reprodukcinei sistemai buvo tiriamas, panaudojant gyvūnų modelius. Pelėms, turinčioms *KISS1* genų mutacijas, nustatytas hipogonadotropinis hipogonadizmas, joms būdinga nepakankama gonadotropinų ir lytinių steroidų gamyba, dėl to jos nepilnai subręsta. Tyrimas, atliktas su lytiškai nesubrendusiomis japoninėmis skumbrėmis *Scomber japonicus*, parodė, kad egzogeninio poodinio kispeptino paskyrimas pagreitina spermatogenezę (51). Kitame tyrime, mokslininkai augino didžiosios kūdrinės varlės *Pelophylax esculentus* sėklidžių ląstelių kultūrą ir

pastebėjo, kad kisperptinas pagreitino lytinių ląstelių brendimą (52). Su pelėmis atlikti tyrimai atskleidė, kad *Kiss1* geno raiškos pradžia sėklidėse sutampa su spermatozoidų formavimusi. Eksperimentai su žiurkėmis parodė, kad egzogeninio kisperptino vartojimas sukelia pradinį testosterono kiekio padidėjimą kraujo plazmoje, tačiau toks poveikis išnyksta, jei kisperptino paskyrimas tęsiamas ilgesnį laiką (46). Šie rezultatai rodo, kad *KISS1* svarbus gyvūnų reprodukciniai sistemai, jų brendimui ir spermatogenezei.

Manoma, kad kisperptinai galėtų būti pritaikyti klinikinėje praktikoje žmonėms, nevaisingumo diagnostikos ir tam tikrų būklių gydymo tikslais. Kisperptino rasta žmonių spermoje (53). Nustatyta teigiama kisperptino kiekio koreliacija su spermatozoidų koncentracija, bendru spermatozoidų skaičiumi ir bendru judrių spermatozoidų skaičiumi. Nevaisingų vyrų spermoje kisperptino kiekis žymiai mažesnis, nei vaisingų. Tad kisperptinas gali būti naudingas kaip vyrų nevaisingumo biožymuo (53). Be to, kisperptinas galėtų būti taikomas terapiniais tikslais. Klinikiniai tyrimai parodė, kad kisperptino agonistai gali paskatinti FSH ir LH išsiskyrimą tiek vyrams, tiek moterims hipogonadotropinio hipogonadizmo atvejais (54).

Funkciniai, gyvūnų modelių tyrimai, aprašytų pacientų klinikinių ir genetinių duomenų analizė rodo, jog *KISS1* geno patogeniniai funkcijos praradimo variantai susiję su vyrų nevaisingumu.

## **IŠVADOS IR KLINIKINIAI PASIŪLYMAI**

### **IŠVADOS**

1. Neaiškios kilmės vyrų nevaisingumas gali būti monogeninės kilmės. Atlikus naujos kartos sekoskaitos tyrimus, galima nustatyti retus ir (ar) naujus patogeninius genų variantus, kurių neįmanoma nustatyti, atliekant įprastinį, profesinių organizacijų rekomenduojamą genetinį ištyrimą. Naujos kartos sekoskaitos tyrimai padėtų kaupti informaciją apie monogenines vyrų nevaisingumo priežastis, suteiktų informacijos genų sąsajų su vyrų nevaisingumu validavimui, sudarytų galimybes tirti patogeninius vyrų nevaisingumo mechanizmus ir šią informaciją galimai pritaikyti diagnostiniams ir terapiniams tikslams.
2. Funkciniai (išorinių ir vidinių dineino šakų) ir gyvūninių modelių (*Drosophila melanogaster*, *Etheostoma caeruleum*, *Sus scrofa domesticus*) tyrimai pagrindžia nevaisingumo dėl patogeninių *SPAG1* geno variantų patogeninį mechanizmą. Geno

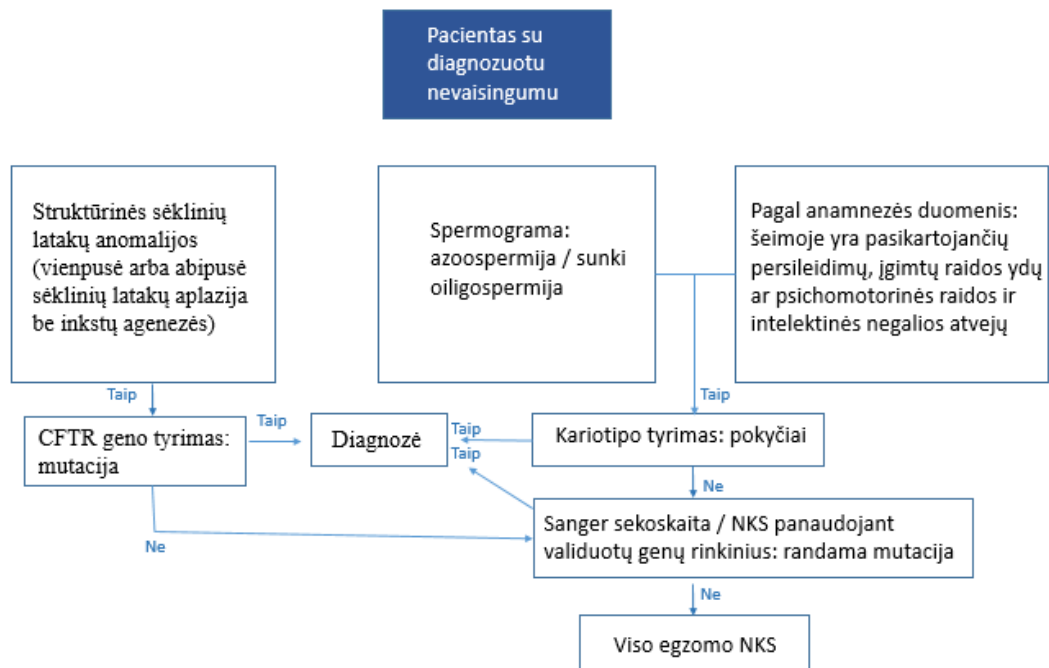
validavimui trūksta didesnio skaičiaus aprašytų pacientų literatūros bazėse.

Nevaisingumas – tikėtinas 28 tipo nejudrių žiuželių sindromo dėl *SPAG1* geno mutacijų klinikinis simptomas.

3. Funkciniai (gonadotropiną atpalaiduojančio hormono išsiskyrimo skatinimas, lėto ir ilgalaikio viduląstelinės  $Ca^{2+}$  koncentracijos padidėjimo sukėlimas); gyvūnų modelių (*Mus domesticus*, *Rattus norvegicus*, *Scomber japonicus*, *Pelophylax esculentus*) tyrimai ir kitų pacientų aprašyti reprodukciniai sutrikimai rodo, jog patogeniniai *KISS1* geno variantai susiję su vyrų nevaisingumu.

## KLINIKINIAI PASIŪLYMAI

1. Siūlomas klinikinio ištyrimo algoritmas:



**2 paveikslas.** Vyro su diagnozuotu nevaisingumu rekomenduojamas genetinis ištyrimas.

Praktikoje tikslinga vyrų nevaisingumo genetinę diagnostiką pradėti pagal Europos Urologų Asociacijos gaires. Siekiant nustatyti konkrečias chromosomines ar genetines anomalijas, iš pradžių atlikti kariotipavimą, tuomet Sanger sekoskaitą arba su liga siejamo validuotų genų rinkinio naujos kartos sekoskaitą (24). Nenustačius patologijos, kaip išsamesnis metodas gali būti naudojama viso egzomo naujos kartos

sekoskaita (28), taip buvo padaryta mūsų atvejais ir nustatyti patogeniniai/ tikėtina patogeniniai variantai, susiję su fenotipu. Nustačius neaiškios reikšmės genetinius variantus, juos reikia papildomai validuoti, kad būtų galima interpretuoti klinikinę reikšmę.

2. Vyrų nevaisingumas turėtų būti įtrauktas kaip svarbus 28 tipo nejudrių žiuželių sindromo klinikinis požymis, taip išplečiant šio sindromo fenotipinį spektrą.
3. Atlikti papildomus kisperitinių panaudojimo kaip nevaisingumo biožymens ir taikymo gydymo tikslais tyrimus.

## LITERATŪROS SĄRAŠAS

1. Oud MS, Volozonoka L, Smits RM, Vissers LELM, Ramos L, Veltman JA. A systematic review and standardized clinical validity assessment of male infertility genes. *Hum Reprod.* 2019 May;34(5):932–41.
2. Oud MS, Smits RM, Smith HE, Mastrosoa FK, Holt GS, Houston BJ, et al. A de novo paradigm for male infertility. *Nat Commun.* 2022 Jan 10;13(1):154.
3. Krausz C, Rosta V, Swerdloff RS, Wang C. 6 - Genetics of Male Infertility. In: Pyeritz RE, Korf BR, Grody WW, editors. *Emery and Rimoin's Principles and Practice of Medical Genetics and Genomics (Seventh Edition)* [Internet]. Academic Press; 2022 [cited 2023 Apr 18]. p. 121–47. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780128152362000102>
4. Krausz C, Riera-Escamilla A. Monogenic Forms of Male Infertility. In: Igaz P, Patócs A, editors. *Genetics of Endocrine Diseases and Syndromes* [Internet]. Cham: Springer International Publishing; 2019 [cited 2023 Apr 23]. p. 341–66. (Experientia Supplementum). Available from: [https://doi.org/10.1007/978-3-030-25905-1\\_16](https://doi.org/10.1007/978-3-030-25905-1_16)
5. Houston BJ, Riera-Escamilla A, Wyrwoll MJ, Salas-Huetos A, Xavier MJ, Nagirnaja L, et al. A systematic review of the validated monogenic causes of human male infertility: 2020 update and a discussion of emerging gene-disease relationships. *Human Reproduction Update.* 2022 Jan 1;28(1):15–29.

6. Minhas S, Bettocchi C, Boeri L, Capogrosso P, Carvalho J, Cilesiz NC, et al. European Association of Urology Guidelines on Male Sexual and Reproductive Health: 2021 Update on Male Infertility. *European Urology*. 2021 Nov 1;80(5):603–20.
7. Kumar N, Singh NK. “Emerging role of Novel Seminal Plasma Bio-markers in Male Infertility: A Review.” *European Journal of Obstetrics & Gynecology and Reproductive Biology*. 2020 Oct 1;253:170–9.
8. Akramienė D. Endokrinologijos praktinis vadovas: leidinys skirtas tik medikams / [Dalia Akramienė] ... [et al.] ; Lietuvos sveikatos mokslų universitetas ; sudarytojas [ir vyriausiasis redaktorius] Antanas Norkus. Kaunas: Medicininės informacijos centras; 2017. 480 p. (Šeimos gydytojo biblioteka).
9. Pelzman DL, Hwang K. Genetic testing for men with infertility: techniques and indications. *Transl Androl Urol*. 2021 Mar;10(3):1354–64.
10. Colaco S, Modi D. Genetics of the human Y chromosome and its association with male infertility. *Reprod Biol Endocrinol*. 2018 Feb 17;16(1):14.
11. Okutman O, Rhouma MB, Benkhalifa M, Muller J, Viville S. Genetic evaluation of patients with non-syndromic male infertility. *J Assist Reprod Genet*. 2018 Nov;35(11):1939–51.
12. Punab M, Poolamets O, Paju P, Vihljajev V, Pomm K, Ladva R, et al. Causes of male infertility: a 9-year prospective monocentre study on 1737 patients with reduced total sperm counts. *Hum Reprod*. 2017 Jan;32(1):18–31.
13. Vockel M, Riera-Escamilla A, Tüttelmann F, Krausz C. The X chromosome and male infertility. *Hum Genet*. 2021 Jan 1;140(1):203–15.
14. Los E, Ford GA. Klinefelter Syndrome. In: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2023 [cited 2023 Apr 25]. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK482314/>
15. Chu KY, Ory J, Punjani N, Nassau DE, Israeli J, Kashanian JA, et al. Utility of evaluating semen samples from adolescents with Klinefelter Syndrome for cryopreservation: A multi-institution evaluation. *Journal of Pediatric Urology*. 2022 Jun 1;18(3):288.e1-288.e5.
16. Andó S, Koczok K, Bessenyei B, Balogh I, Ujfalusi A. Cytogenetic Investigation of Infertile Patients in Hungary: A 10-Year Retrospective Study. *Genes*. 2022 Nov;13(11):2086.
17. Krausz C, Cioppi F. Genetics of Male Infertility. In: Huhtaniemi I, Martini L, editors. *Encyclopedia of Endocrine Diseases (Second Edition)* [Internet]. Oxford: Academic Press; 2019

[cited 2023 Apr 25]. p. 821–30. Available from:

<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780128012383657379>

18. Jiao SY, Yang YH, Chen SR. Molecular genetics of infertility: loss-of-function mutations in humans and corresponding knockout/mutated mice. *Hum Reprod Update*. 2021 Jan 4;27(1):154–89.
19. Laan M, Kasak L, Punab M. Translational aspects of novel findings in genetics of male infertility—status quo 2021. *Br Med Bull*. 2021 Nov 9;140(1):5–22.
20. Persily JB, Vijay V, Najari BB. How do we counsel men with obstructive azoospermia due to CF mutations?—a review of treatment options and outcomes. *Transl Androl Urol*. 2021 Mar;10(3):1467–78.
21. Primary Ciliary Dyskinesia - Symptoms, Causes, Treatment | NORD [Internet]. [cited 2023 May 8]. Available from: <https://rarediseases.org/rare-diseases/primary-ciliary-dyskinesia/>
22. Vanaken GJ, Bassinet L, Boon M, Mani R, Honoré I, Papon JF, et al. Infertility in an adult cohort with primary ciliary dyskinesia: phenotype–gene association. *European Respiratory Journal* [Internet]. 2017 Nov 1 [cited 2023 May 10];50(5). Available from: <https://erj.ersjournals.com/content/50/5/1700314>
23. Testicular Disorders - ScienceDirect [Internet]. [cited 2023 Apr 25]. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780323297387000198>
24. Krausz C, Riera-Escamilla A. Genetics of male infertility. *Nat Rev Urol*. 2018 Jun;15(6):369–84.
25. Tüttelmann F, Ruckert C, Röpke A. Disorders of spermatogenesis. *Med Genet*. 2018;30(1):12–20.
26. Ellnati E, Fossard C, Okutman O, Ghédir H, Ibalá-Romdhane S, Ray PF, et al. A new mutation identified in SPATA16 in two globozoospermic patients. *J Assist Reprod Genet*. 2016 Jun;33(6):815–20.
27. Lek M, Karczewski KJ, Minikel EV, Samocha KE, Banks E, Fennell T, et al. Analysis of protein-coding genetic variation in 60,706 humans. *Nature*. 2016 Aug 18;536(7616):285–91.
28. Oud MS, Ramos L, O’Bryan MK, McLachlan RI, Okutman Ö, Viville S, et al. Validation and application of a novel integrated genetic screening method to a cohort of 1,112 men with idiopathic azoospermia or severe oligozoospermia. *Human Mutation*. 2017;38(11):1592–605.



29. Cannarella R, Precone V, Guerri G, Busetto GM, Di Renzo GC, Gerli S, et al. Clinical Evaluation of a Custom Gene Panel as a Tool for Precision Male Infertility Diagnosis by Next-Generation Sequencing. *Life (Basel)*. 2020 Oct 15;10(10):242.
30. Knowles MR, Ostrowski LE, Loges NT, Hurd T, Leigh MW, Huang L, et al. Mutations in SPAG1 Cause Primary Ciliary Dyskinesia Associated with Defective Outer and Inner Dynein Arms. *Am J Hum Genet*. 2013 Oct 3;93(4):711–20.
31. Horani A, Ustione A, Huang T, Firth AL, Pan J, Gunsten SP, et al. Establishment of the early cilia preassembly protein complex during motile ciliogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2018 Feb 6;115(6):E1221–8.
32. Chagot ME, Dos Santos Morais R, Dermouche S, Lefebvre D, Manival X, Chipot C, et al. Binding properties of the quaternary assembly protein SPAG1. *Biochemical Journal*. 2019 Jun 14;476(11):1679–94.
33. Zur Lage P, Newton FG, Jarman AP. Survey of the Ciliary Motility Machinery of *Drosophila* Sperm and Ciliated Mechanosensory Neurons Reveals Unexpected Cell-Type Specific Variations: A Model for Motile Ciliopathies. *Front Genet*. 2019;10:24.
34. Sironen A, Shoemark A, Patel M, Loebinger MR, Mitchison HM. Sperm defects in primary ciliary dyskinesia and related causes of male infertility. *Cell Mol Life Sci*. 2020;77(11):2029–48.
35. Tadesse A, Alemu H, Silamsaw M, Gebrewold Y. Kartagener’s syndrome: a case report. *J Med Case Rep*. 2018 Jan 10;12:5.
36. Djakow J, Kramná L, Dušátková L, Uhlík J, Pursiheimo JP, Svobodová T, et al. An effective combination of sanger and next generation sequencing in diagnostics of primary ciliary dyskinesia. *Pediatr Pulmonol*. 2016 May;51(5):498–509.
37. Guo Z, Chen W, Wang L, Qian L. Clinical and Genetic Spectrum of Children with Primary Ciliary Dyskinesia in China. *The Journal of Pediatrics*. 2020 Oct 1;225:157-165.e5.
38. Davis SD, Ferkol TW, Rosenfeld M, Lee HS, Dell SD, Sagel SD, et al. Clinical features of childhood primary ciliary dyskinesia by genotype and ultrastructural phenotype. *Am J Respir Crit Care Med*. 2015 Feb 1;191(3):316–24.
39. Zhang ML, Wang LF, Miao SY, Koide SS. Isolation and sequencing of the cDNA encoding the 75-kD human sperm protein related to infertility. *Chin Med J (Engl)*. 1992 Dec;105(12):998–1003.

40. Lin W, Zhou X, Zhang M, Li Y, Miao S, Wang L, et al. Expression and function of the HSD-3.8 gene encoding a testis-specific protein. *Molecular Human Reproduction*. 2001 Sep 1;7(9):811–8.
41. zur Lage P, Stefanopoulou P, Styczynska-Soczka K, Quinn N, Mali G, von Kriegsheim A, et al. Ciliary dynein motor preassembly is regulated by Wdr92 in association with HSP90 co-chaperone, R2TP. *J Cell Biol*. 2018 Jul 2;217(7):2583–98.
42. Bahamonde PA, McMaster ME, Servos MR, Martyniuk CJ, Munkittrick KR. Characterizing Transcriptional Networks in Male Rainbow Darter (*Etheostoma caeruleum*) that Regulate Testis Development over a Complete Reproductive Cycle. *PLoS One*. 2016 Nov 18;11(11):e0164722.
43. Hu P, Guan K, Feng Y, Ma C, Song H, Li Y, et al. miR-638 Inhibits immature Sertoli cell growth by indirectly inactivating PI3K/AKT pathway via SPAG1 gene. *Cell Cycle*. 2017;16(23):2290–300.
44. PubChem. KISS1 - KiSS-1 metastasis suppressor (human) [Internet]. [cited 2022 May 13]. Available from: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/gene/KISS1/human>
45. Sivalingam M, Parhar IS. Hypothalamic kisspeptin and kisspeptin receptors: Species variation in reproduction and reproductive behaviours. *Frontiers in Neuroendocrinology*. 2022 Jan 1;64:100951.
46. Blasco V, Pinto FM, González-Ravina C, Santamaría-López E, Candenas L, Fernández-Sánchez M. Tachykinins and Kisspeptins in the Regulation of Human Male Fertility. *Journal of Clinical Medicine*. 2020 Jan;9(1):113.
47. Marques P, Skorupskaite K, Rozario KS, Anderson RA, George JT. Physiology of GnRH and Gonadotropin Secretion. In: Feingold KR, Anawalt B, Blackman MR, Boyce A, Chrousos G, Corpas E, et al., editors. *Endotext* [Internet]. South Dartmouth (MA): MDText.com, Inc.; 2000 [cited 2023 Apr 24]. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK279070/>
48. Pagani S, Calcaterra V, Acquafredda G, Montalbano C, Bozzola E, Ferrara P, et al. MKRN3 and KISS1R mutations in precocious and early puberty. *Italian Journal of Pediatrics*. 2020 Mar 30;46(1):39.
49. Clinical Synopsis - #614842 - HYPOGONADOTROPIC HYPOGONADISM 13 WITH OR WITHOUT ANOSMIA; HH13 - OMIM [Internet]. [cited 2023 Apr 17]. Available from: <https://www.omim.org/clinicalSynopsis/614842>

50. Human Phenotype Ontology [Internet]. [cited 2023 May 15]. Available from: <https://hpo.jax.org/app/browse/gene/3814>
51. Selvaraj S, Ohga H, Nyuji M, Kitano H, Nagano N, Yamaguchi A, et al. Subcutaneous administration of Kiss1 pentadecapeptide accelerates spermatogenesis in prepubertal male chub mackerel (*Scomber japonicus*). *Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol*. 2013 Oct;166(2):228–36.
52. Chianese R, Ciaramella V, Fasano S, Pierantoni R, Meccariello R. Kisspeptin drives germ cell progression in the anuran amphibian *Pelophylax esculentus*: a study carried out in ex vivo testes. *Gen Comp Endocrinol*. 2015 Jan 15;211:81–91.
53. Zou P, Wang X, Chen Q, Yang H, Zhou N, Sun L, et al. Kisspeptin Protein in Seminal Plasma Is Positively Associated with Semen Quality: Results from the MARHCS Study in Chongqing, China. *Biomed Res Int*. 2019 Jan 9;2019:5129263.
54. Hunjan T, Abbara A. Clinical Translational Studies of Kisspeptin and Neurokinin B. *Semin Reprod Med*. 2019 May;37(3):119–24.