

Y KROMOSZÓMA ELVÁLTOZÁSOK ÉS POLIMORFIZMUSOK NEMZŐKÉPTELEN FÉRFIAKNÁL

Bellovits Orsolya¹, Rusz András², Fodor Flóra³, Csonka Erika⁴, Hadlaczky Gyula⁴ és
Bujdosó Györgyi¹

¹Semmelweis Egyetem, Igazságügyi Orvostani Intézet, Budapest, ²Semmelweis Egyetem,
Urológiai Klinika, Budapest, ³LabOrigo Molekuláris Diagnosztika, Budapest,
⁴Szegedi Biológiai Kutatóközpont, Genetikai Intézet, Magyar Tudományos Akadémia, Szeged

Bellovits, O., Rusz, A., Fodor, F., Csonka, E., Hadlaczky, Gy., Bujdosó, Gy.: *Y chromosome aberrations and polymorphisms in patients with reproductive failure. Data from the Hungarian Central Statistical Office shows that infertility affects about 150,000 couples in Hungary, which means that one in every seven couples has problems in conceiving, and this number increases continuously. Nowadays the significance of genetic examination is to diagnose the cause of infertility and to help making conception by assisted reproductive techniques for many couples with severe male factor infertility. The aim of our examination was to investigate Y chromosome aberrations and polymorphisms in infertile male with compared to fertile control men. Sixty men applied for assisted reproduction technique and undertook the genetic examination during 2003 and 2006. The genetical examination included classical cytogenetic methods (GTG, QFQ, CBG and NOR banding techniques), FISH analyses and molecular characterisation of Y chromosome. The infertile male group was compared with 568 fertile males (control) who took part in paternity cases in our laboratory. Our results confirmed that beside the Klinefelter syndrome (8.3%) the extra Y chromosome (3.3%), and Y chromosome microdeletion (3.3%) were the most frequent disorders. Examination of the incidence of fluorescence polymorphisms of Y chromosome did not show significant difference between the fertile and infertile men. Incidence of extreme size (large and small) polymorphisms of Y chromosome was higher in the infertile male group than the expected value; hence the Y chromosome with extreme size can be in connection with infertility. In addition to the routine andrological examination of infertile men, the necessity of genetic investigations can be proved by the numerous chromosome disorders.*

Keywords: Male infertility; Azoospermia; Y chromosome aberrations; Polymorphisms.

Bevezetés

A Központi Statisztikai Hivatal adatai szerint Magyarországon 100–150 ezerre becsülhető a meddő párok száma, vagyis ez minden 7. házaspárt érint, és ez a szám napjainkban is egyre növekszik. A kutatások azt bizonyítják, hogy a meddőség oka az esetek 40%-ában a nőben, 40%-ban a férfiben, 20%-ban mindkét félben keresendő. Az andrológiai, illetve nőgyógyászati kivizsgálás során, fiziológiai okok hiányában, a meddőség okaként felmerülhet valamilyen genetikai rendellenesség (Papp 1996, Kéry 2000, Rózsahegy 2003). A genetikai elváltozások (10–15%) a férfi infertilitás egyik legfőbb okát képezik, ezek 80%-át a nemi kromoszómák rendellenessége teszi ki (Pienna-Videau és mtsai 2001, Huynh és mtsai 2002).

A genetikai vizsgálat a férfi meddőség kezelési esélyeinek megítélésére az 1980-as évek óta alkalmazott módszer. Napjainkban a genetikai vizsgálatok jelentőségét növeli a betegség diagnosztizálása mellett az egyre elterjedtebb mesterséges megtermékenyítési

programokban való sikeres részvétel esélyeinek megadása azon házaspárok számára is, akiknek valamilyen elváltozás miatt természetes úton nem születhet gyermekük.

Vizsgált személyek és Alkalmazott módszerek

A vizsgálati személyek 2003 és 2006 között többnyire a Semmelweis Egyetem Urológiai Klinikájának Andrológiai szakambulanciáján meddőségi kivizsgálásra jelentkező 2790 férfi közül kerültek ki. Az andrológiai kivizsgáláson résztvevő személyek közül azok kerültek a vizsgálati mintába, akik az Egészségügyi Minisztérium reprodukciós elégtelenség genetikai kivizsgálására megfogalmazott szakmai protokolljában (Klinikai Genetikai Szakmai Kollégium 2006) lévőeknek eleget tettek. A szakmai protokollnak megfelelően olyan párok férfi tagjait vontuk be a vizsgálatokba, akik azoospermiasok, vagy súlyos oligozoospermiasok, és meddőségüknek nincs fiziológiai magyarázata, partnerükkel való több, mint egy éves együttélés után nem történt megtermékenyítés, vagy kórtörténetükben többször spontán abortált magzat szerepelt. A 2790 férfiből 1694 (61%) bizonyult normospermiasnak, 790-nél (28%) enyhébb fokú oligospermia igazolódott, 306-nál (11%) pedig azoospermiát vagy súlyos fokú oligozoospermiát találtunk. A nem obstruktív azoospermiasok közül 60 férfi vállalta, vagy kérte a genetikai vizsgálatokon való részvételt is (ebből 55 férfi a Semmelweis Egyetem Urológiai Klinikájáról, a többiek más szakrendelőkből kerültek ki).

A Semmelweis Egyetem Igazságügyi Orvostani Intézetében folyó származásmegállapítási-vizsgálatok jó alkalmat kínáltak arra, hogy a meddő férfiak vizsgálati eredményeit összehasonlíthassuk fertilis társaikkal (Bujdosó 1985, Bellovits és mtsai 2006). Kontrollként 1990–2006 között apaságvizsgálaton megjelent 568 férfi kromoszóma vizsgálati eredményét használtuk, akik az ország egész területéről kerültek hozzánk vizsgálatra (Décsey és mtsai 2006). Közülük 20 férfi DNS vizsgálati eredményét használtuk az Y mikrodélécio vizsgálatok kontrolljaként.

A genetikai vizsgálatokhoz valamennyi mintavétel – ideértve a nemzőképtelen és a kontroll csoportot is – a Semmelweis Egyetem Igazságügyi Orvostani Intézetében történt. A citogenetikai vizsgálatokat a SE Igazságügyi Orvostani Intézetének Humángenetikai Laboratóriumában végeztük. A nemzőképtelenség hátterében meghúzódó esetleges kromoszómális okok tisztázása érdekében GTG, CBG (Sumner és mtsai 1971), QFQ (Casperson és mtsai 1970) és esetenként NOR (Bloom és Goodpasture 1976) festési technikákat alkalmaztunk. A molekuláris citogenetikai vizsgálatokat a Szegedi Biológiai Központ Genetikai Intézetében készítettük el. Az Y kromoszóma molekuláris genetikai vizsgálatára (Simoni és mtsai 2004) a würzburgi Orvosi Laboratóriumban, valamint a budapesti LabOrigo Molekuláris Genetikai Laboratóriumban került sor.

Vizsgálati eredmények és Esetbemutató

A kontrollcsoportban 1 férfinél találtunk dupla Y kromoszómát, aki az apaságvizsgálat során nemzőapának bizonyult, egy másik esetben a gyermeknél volt számszerű Y kromoszóma. A nemzőképtelen vizsgálati anyagban a 60 férfi közül kettőnél 47,YYY szindrómát találtunk, ugyancsak kettőnél az Y kromoszóma mikrodélécioja igazolódott.

Az egyik extra Y kromoszómát (1. ábra) hordozó férfi (P1) esetében spermiumot mind az ejakulátumban, mind a hereszövetben találtunk, a másik (P2) esetében heresorvadást, spermatogenezis súlyos károsodását mutattuk ki. Mindkettejük esetében

baloldali herevisszérsérv szerepelt a kórtörténetben. A P2 férfi esetén a súlyosabb tüneteket a magasabb életkorral, vagy egyéb befolyásoló genetikai faktorokkal magyarázhatjuk.

Az Y kromoszóma mikrodelécióját hordozó egyik férfinél (P3) citogenetikai módszerekkel elváltozás nem volt észlelhető, azonban a molekuláris genetikai vizsgálatok az Y kromoszóma AZFc régiójának mikrodelécióját igazolták (1. táblázat). A másik, alacsony testmagasságú férfi (P4) heréjének szövettani vizsgálata gátolt érést, „Sertoli cell only” szindrómát mutatott. A citogenetikai vizsgálatok során kétféle kariotípust találtunk: az egyik 45,X0-nak bizonyult a leszámolt mitotikus metafázisok több mint 90%-ában. A sejtek kevesebb, mint 10%-a egy kicsi, nem fluoreszkáló, heterokromatikus részét elvesztett, deléciós Y kromoszómát hordozott (2. ábra). A molekuláris genetikai vizsgálat az Y kromoszóma AZFb és AZFc régiójának hiányát mutatta ki (1. táblázat).

1. táblázat. P3–4 vizsgálati személyek Y kromoszóma molekuláris genetikai analízise.
Table 1. Molecular genetic analysis of Y chromosome of patients 3–4.

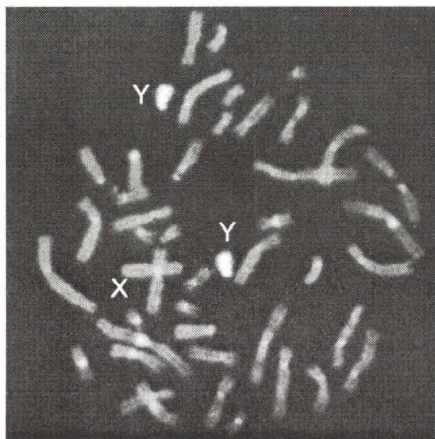
	P3	P4
sY84/AZFa	+	+
sY86/AZFa	+	+
sY114/AZFb	+	–
sY127/AZFb	+	–
sY134/AZFb	+	–
sY143/AZFb	+	–
sY152/AZFc	–	–
sY157/AZFc	–	–
sY158/AZFc	–	–
sY254/AZFc	–	–
sY255/AZFc	–	–

+ : STS (sequence tagged site) régió jelen van (STS region exists)

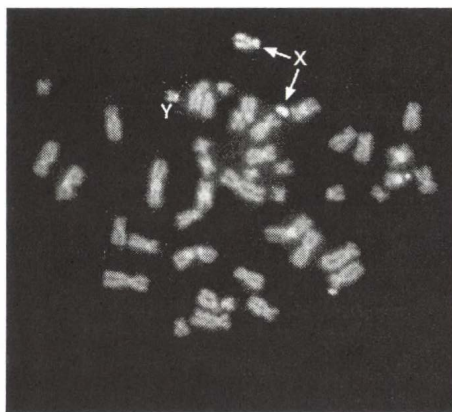
– : STS (sequence tagged site) régió hiányzik (missing STS region)

Az Y kromoszóma méretének polimorfizmusa (Méhes 1977, Kosztolányi 1982, Simi és Tursi 1982) és a nemzőképtelenség közötti kapcsolat tisztázása érdekében az extrém nagy és kis Y esetén végeztünk részletesebb vizsgálatokat (3–4. ábra; Kjessler 1972, Foresta és mtsai 2002). Ennek érdekében a vizsgálati mintában kapott méret polimorfizmus előfordulási gyakoriságokat összevetettük a fertilis csoport eredményeivel. Azt találtuk, hogy a nagyobb méretű (nagy és nagyon nagy) Y kromoszómák a nemzőképteleneknél (70,0%) az egészséges férfiakhoz (72,5%) hasonló arányban szerepeltek. A nemzőképtelenek között azonban 6,7%-ban óriási Y kromoszómát találtunk (Yqh+: az Y kromoszóma F csoportbeli kromoszómákhoz hasonlított mérete meghaladta az 1,1-es értéket). A kontroll csoportban egy férfi rendelkezett ekkora Y kromoszómával (0,2%). Kicsi és nagyon kicsi Y kromoszóma a nemzőképteleneknél összesen 5,0%-ban fordult elő, hasonlóan az egészségeseknél tapasztalt 5,6%-hoz. Ha a nagyon-kicsi Y kromoszómát (Yqh-: az Y kromoszóma F csoportbeli kromoszómákhoz hasonlított mérete nem érte el a 0,7-es értéket) hordozó férfiak csoportját önmagában vizsgáltuk, a nemzőképteleneknél nagyobb gyakoriságot (1,7% szemben a 0,4%-al) észleltünk.

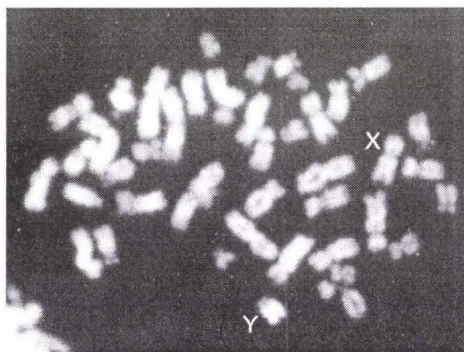
Az Y kromoszóma mérete mellett fluoreszcencia intenzitását is megvizsgáltuk mind a nemzőképtelen, mind a kontroll csoportban. A fluoreszcencia intenzitás két szélső értékét tekintve, a ragyogó Y kromoszóma az egészségeseknél 11,1%-ot, a nemzőképteleneknél 8,3%-ot tett ki, míg a nem fluoreszkáló Y kromoszóma esetén 1,5% és 1,7% volt az előfordulási gyakoriság a két csoportban.



1. ábra: 47,XYY szindróma (FISH).
Figure 1: 47,XYY syndrome (FISH).



2. ábra: Deléció Y és törött X kromoszóma (FISH).
Figure 2: Deleted Y and broken X chromosome (FISH).



3. ábra: Hatalmas, fluoreszkáló Y kromoszóma (Q-sáv).
Figure 3: Huge Y chromosome with brilliant fluorescence (Q-band).



4. ábra: Kicsi, alig fluoreszkáló Y kromoszóma (Q-sáv).
Figure 4: Small Y chromosome with weak fluorescence (Q-band).

Megbeszélés

Vizsgálati mintánkban a férfi nemzőképtelenséggel összefüggésbe hozható Y kromoszóma elváltozások közül az extra Y kromoszóma és az Y kromoszóma mikrodeléciója egyaránt 3,3%-ban fordult elő.

Az irodalmi adatok a 47,YYY szindrómát 1–2%-ban említik az infertilitás okai között. Vizsgálati anyagunkban e kromoszóma rendellenesség magasabb, 3,3%-os előfordulási gyakoriságának oka lehet a megvizsgált nemzőképtelen férfiak alacsony száma is. A számfeletti Y kromoszómával rendelkező két férfinél a kromoszóma elváltozás mellett a spermatogenezist gátló egyéb genetikai károsító faktorok hatása befolyásolhatta a rossz spermogram eredményeket. Irodalmi tény, hogy a számfeletti Y kromoszómával rendelkező férfiak nagy része fertilis (erre példa a kontroll csoportunkban előforduló dupla Y-al rendelkező férfi bizonyított apasága is). Ennek ellenére a rendellenesség felismerése esetükben is fontos lenne, hiszen a nemi kromoszóma elváltozást hordozó férfiak utódaiban megnő a kockázata mind az autoszómális, mind a nemi kromoszómák rendellenességeinek (Wang és mtsai 2000, Fagerstrom és mtsai 2002, Kónya és mtsai 2003, Lanfranco és mtsai 2004).

Az Y kromoszóma mikrodeléciójával kapcsolatos eredményeink azt támasztják alá, hogy mikrodeléciós Y kromoszómát hordozó személyek esetében a nemzőképesség csökkenésének mértékét egyértelműen a deléciós régió mérete, ezáltal a deletált gének száma és funkciója határozza meg (Foresta és mtsai 2001). E férfiaknál tehát az elváltozás kimutatásával nemcsak a nemzőképtelenség okára, hanem a deléció elhelyezkedése és kiterjedtsége alapján a heréből történő spermiumnyerés várható eredményére is fény derülhet. Így a P3 férfinél, ahol csak az Y kromoszóma AZFc régiója hiányzott, jó eséllyel található a herebiopátumban megfelelő spermium, míg P4 páciens esetében, ahol a deléció nagyobb szakaszt érintett, erre nincs reális esély. Tehát időben, pontosan diagnosztizálva a mikrodeléció méretét és helyzetét, a betegeket megkíméljük a további felesleges beavatkozásoktól. Igazolt mikrodeléció esetén ezen kívül javasolt a fiatal korban gyűjtött ondóminták mélyfagyasztása és tárolása, mivel a spermiumszám az enyhébb esetekben is drasztikusan csökken az életkor előrehaladtával. Ezekre a betegekre különös figyelmet kell fordítani az elváltozás következő generációra való átörökítése miatt is (Patsalis és mtsai 2002), akiknél a kiesés nagyobb területet is érinthet, mint édesapjuknál (Hargreave 2000).

A nemzőképtelenség mellett az Y kromoszómán található más gének kiesése egyéb fenotípusos elváltozást is okozhatnak (Kosztolányi és Trixler 1983), mint például mintánkban P4 férfinél az alacsony termetet eredményező GCY növekedést kontrolláló gén kiesése (a SHOX gén haploin-szufficienciája is okozhat alacsony növést; Lin és mtsai 2004). Ugyanezen P4 páciens 45,X/46,XderY kariotípusa esetében a férfi fenotípusos megjelenést nem a mikrodeléciós Y kromoszóma mozaikos előfordulási aránya (10%), illetve a 45,X0 sejtek gyakorisága (90%), hanem az SRY gén megléte határozta meg (Siffroi és mtsai 2000).

Az Y kromoszóma elváltozásai mellett a méret és fluoreszcencia intenzitás variánsait azokban az esetekben vizsgálva, ahol a szélsőséges érték túlmutathat a normál polimorfizmuson, arra a következtetésre jutottunk, hogy mivel az Y kromoszóma szélsőséges (nagyon nagy és nagyon kicsi) méreteinek előfordulási gyakorisága a várt értéknél nagyobb volt, így az extrém méretű Y kromoszóma egyes esetekben összefüggésben állhat a nemzőképtelenség kialakulásával. Nagy heterokromatinú Y kromoszóma esetén megnőhet a kockázata a spontán abortusznak, esetleg a kromoszóma

nagyobb törékenysége miatt (Bhasin 2005, Nagvenkar és mtsai 2005). Az extrém hosszú Y kromoszóma a dupla Y-hoz hasonló fenotípusos megjelenést és klinikai tüneteket is okozhat. A nagyon kis heterokromatinú Y kromoszóma a normál polimorfizmus mellett a deléció lehetőségét is felveti, ezért ezekben az esetekben Y specifikus DNS vizsgálat elvégzése okvetlenül szükséges. A fertilis csoporthoz viszonyított nemzőképtelen mintánkban a vártnál nagyobb gyakorisági értékek azonban adódhattak a célzott mintavételből és a minta különböző merítettségéből is.

Az Y kromoszóma fluoreszcencia intenzitás polimorfizmusának eloszlását vizsgálva az egészséges és nemzőképtelen férfiak között nem találtunk szignifikáns különbséget.

Összefoglalásként elmondható, hogy a nemzőképtelen férfiak általános andrológiai kivizsgálása mellett a genetikai vizsgálatok is szükségesek, mivel az okok pontos, időben történő feltérképezésével a hosszadalmas és költséges vizsgálatoktól, esetleg felesleges műtéti beavatkozásoktól, gyógyszeres kezelésektől kímélhetjük meg a betegeket.

Irodalom

- Bhasin, M.K. (2005): Human population cytogenetics: A review. *Int. J. Hum. Genet.*, 5: 83–152.
- Bellovits, O., Rusz, A., Romics, I., Csonka, E., Hadlaczy, Gy., Bujdosó, Gy., Sótónyi, P. (2006): Az azoospermia háttérében meghúzódó kromoszóma-eltérések. *Orv. Hetil.*, 147: 531–535.
- Bloom, S.E., Goodpasture, C. (1976): An improved technique for selective silver staining of nucleolar organizer regions in human chromosomes. *Hum. Genet.*, 34: 199–206.
- Bujdosó, M.Gy. (1985): Kromoszómavizsgálatok. In: Bujdosó, M.Gy. (Szerk.) *X vagy Y. Apaságvizsgálat, igazságszolgáltatás*. Medicina Könyvkiadó, Budapest, 198–213.
- Casperson, T., Zech, L., Johannson, C. (1970): Quinacrine mustard fluorescence of human chromosomes. *Exp. Cell Res.*, 61: 474–475.
- Décsey, K., Bellovits, O., Bujdosó, Gy. (2006): Human chromosomal polymorphism in a Hungarian sample. *Int. J. Hum. Genet.*, 6: 177–183.
- Fagerstrom, C., Himes, P., Olson, S. (2002): 47,XYY syndrome. In: Silvey, K. (Ed.) *Sex chromosome problems discovered through prenatal diagnosis*. Pacific Northwest Regional Genetics Group.
- Foresta, C., Ferlin, A., Gianaroli, L., Dallapiccola, B. (2002): Guidelines for the appropriate use of genetic tests in infertile couples. *Eur. J. Hum. Genet.*, 10: 303–312.
- Foresta, C., Moro, E., Ferlin, A. (2001): Y chromosome microdeletion and alteration of spermatogenesis. *Endocr. Rev.*, 22: 226–239.
- Hargreave, T.B. (2000): Genetics and male infertility. *Curr. Opin. Obstet. Gynecol.*, 12: 207–219.
- Huynh, T., Mollard, R., Trounson, A. (2002): Selected genetic factors associated with male infertility. *Hum. Reprod.*, 8: 183–198.
- Kéry, S. (2000): Genetikai eltérések jelentősége az andrológiában. In: Papp, Gy. (Szerk.): *Az andrológia tankönyve*. Medicina Könyvkiadó Rt., Budapest, 155.
- Kjessler, B. (1972): Facteurs genetiques dans la subfertilité male humaine. In: Masson, V. (Ed.) *Fecondité et stérilité du male: Acquisition recentes*. Masson, Paris.
- Klinikai Genetikai Szakmai Kollégium (2006): *Az Egészségügyi Minisztérium szakmai protokollja. Reprodukciós elégtelenség genetikai kivizsgálása*. Érvényesség: 2008. december 31.
- Kónya, M., Mátyás, Sz., Balogh, I., Kurcsics, J., Papp, Gy., Kováts, T., Rajczy, K., Bernard, A., Krizsa, F., Szmátóna, G., Gáti, I., Kaali, S.G., Szentirmay, Z. (2003): Y-kromoszóma mikrodeléció kimutatásának és kariotípus meghatározásának jelentősége azoospermias és oligozoospermias férfiaknál. *Magy. Androl.*, 8: 21–24.
- Kosztolányi, Gy. (1982): C-Band Polymorphismus des Chromosomen 1, 9, 16 und Y. *Wissenschaftliche Information Milupa*, 8: 95–102.
- Kosztolányi, Gy., Trixler, M. (1983): Yq deletion with short stature, abnormal male development, and schizoid character disorder. *J. Med. Genet.*, 20: 393–394.

- Lanfranco, F., Kamischke, A., Zitzmann, M., Nieschlag, E. (2004): Klinefelter's syndrome. *Lancet*, 364: 273–283.
- Lin, Y.H., Lin, Y.M., Lin, Y.H., Chuang, L., Wu, S.Y., Kuo, P.L. (2004): Ring (Y) in two azoospermic men. *Am. J. Med. Genet.*, 128A: 209–213.
- Méhes, K. (1977): A chromosoma-vizsgálat leleteinek értékelhetősége (polymorphismus). In: Schuler, D. (Szerk.) *A human chromosoma-aberrációk jelentősége a klinikumban*. Akadémiai Kiadó, Budapest, 338–379.
- Nagvenkar, P., Desai, K., Hinduja, I., Zaveri, K. (2005): Chromosomal studies in infertile men with oligozoospermia and non-obstructive azoospermia. *Indian J. Med. Res.*, 122: 34–42.
- Papp, Gy. (1996): Férfimeddség. *Háziorvos Továbbképző Szemle*, 1: 255–257.
- Patsalis, P.C., Sismani, C., Quintana-Murci, L., Taleb-Bekkouche, F., Krausz, Cs., McElreavey, K. (2002): Effects of transmission of Y chromosome AZFc deletions. *Lancet*, 360: 1222–1224.
- Pienna-Videau, S., Araujo, H., Ballesta, F., Balleca, J.L., Vanrell, J.A. (2001): Chromosomal abnormalities and polymorphisms in infertile men. *Arch. Androl.*, 46: 205–210.
- Rózsahegyi, J. (2003): A férfi nemzőképességi zavarok. In: Rózsahegyi, J. (Szerk.) *Férfidolgozról nemcsak férfiaknak*. Budakönyvek Kft., Budapest, 135–187.
- Siffroi, J.P., Le Bourhis, C., Krausz, Cs., Barboux, S., Quintana-Murci, L., Kanafani, S., Rouba, H., Bujan, L., Bourrouillou, G., Seifer, I., Boucher, D., Fellous, M., McElreavey, Dadoune, J.P. (2000): Sex chromosome mosaicism in males carrying Y chromosome long arm deletions. *Hum. Reprod.*, 15: 2559–2562.
- Simi, S., Tursi, F. (1982): Polymorphism of human chromosomes 1, 9, 16, Y: Variations, segregation and mosaicism. *Hum. Genet.*, 62: 217–220.
- Simoni, M., Bakker, A., Krausz, C. (2004): EAA/EMQN best practice guidelines for molecular diagnosis of y-chromosomal microdeletions. State of the art 2004. *Int. J. Androl.*, 27: 240–249.
- Sumner, A.T., Evans, H.J., Buckland, R. (1971): New technique for distinguishing between human chromosomes. *Nature New Biology*, 31: 232.
- Wang, J.Y., Samura, O., Zhen, D.K., Cowan, J.M., Cardone, V., Summers, M., Bianchi, D.W. (2000): Fluorescence in-situ hybridization analysis of chromosomal constitution in spermatozoa from a mosaic 47,XYY/46XY male. *Mol. Hum. Reprod.*, 6: 665–668.

Levelezési cím: Bellovits Orsolya
 Mailing address: Semmelweis Egyetem
 Igazságügyi Orvostani Intézet
 H-1091 Budapest
 Üllői út. 93.
 Hungary
 bellovor@yahoo.com, bujgyo@igaz.sote.hu

