

A FÉRFI NEMZŐKÉPTELENSÉG HÁTTERÉBEN MEGHÚZÓDÓ KROMOSZÓMA ELVÁLTOZÁSOK ÉS POLIMORFIZMUSOK

Bellovits Orsolya

Eötvös Loránd Tudományegyetem, Embertani Tanszék, Budapest
Témavezető: Dr. Bodzsár Éva egyetemi tanár

Bellovits, O.: *Chromosomal abnormalities and polymorphisms in the background of the male infertility.* Nowadays more and more couples face the fact that they cannot have babies in spite of many years of trying. The male factor can be identified in about half of these cases. In the background of the male infertility can be physiological, genetical or psychological problems.

The aim of this study was to analyse chromosomal alterations and polymorphisms in patients with azoospermia.

Preoperative evaluation included routine andrological investigation with 2 semen analysis, ultrasound, hormonal and genetic examination. Between January 2003 and December 2006 in order to obtain an exact diagnosis, the traditional cytogenetic methods were performed in combination with fluorescence in situ hybridization analyses and molecular genetic techniques in case of 60 infertile men.

In this study, the most characteristic cases were numerical deviations. The most frequent alteration was the Klinefelter's syndrome (five cases=8,3%), such as 47,XXY in four cases and mosaic 47,XXY/49,XXXXY form in one case. In case of two men (3,3%) we found 47,XXY syndrome, and in one man mosaic 45,X/46,XderY karyotype (1,7%). In this last case the molecular genetics investigation proved the deletion of AZFb and AZFc region in the Y chromosome and also in another man in the AZFc region (total: 3,3%).

In case of the men with the same chromosome abnormalities, the seriousness of the syndrome was depending on the differences of genetical, physiological background and also the life style of the patient. During the investigation of the chromosome polymorphism, we found significant differentiation between the infertile and the control groups in case of No9 and Y chromosomes, which proved the connection between these chromosomes and the development of the infertility.

The high frequencies of the chromosome abnormalities confirm the importance of cyto- and molecular examinations in cases of infertile men. The results provide a chance for patients to be spared from unnecessary medications and operations.

Keywords: Male infertility; Azoospermia; Chromosome aberrations; Polymorphisms.

Tudományos előzmények

A Központi Statisztikai Hivatal adatai szerint Magyarországon 100–150 ezerre becsülhető a meddő párok száma, vagyis minden 7. házaspárnak nem adatik meg, hogy gyermekük legyen, és ez a szám napjainkban is egyre növekszik. A kutatások azt bizonyítják, hogy a gyermektelenségért az esetek 40%-ában a nő, 40%-ban a férfi a felelős, 20%-ban mindkét félben megtalálható valamilyen kórok. Az andrológiai, illetve nőgyógyászati kivizsgálás során, fiziológiai okok hiányában, a meddőség okaként felmerülhet valamilyen genetikai rendellenesség. 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.

A férfi nemzőképesség csökkenhet nem megfelelő mennyiségű és minőségű (pH-jú, fruktóz tartalmú, elfolyósodás idejű) ondó, valamint a csökkent spermiumszám és mozgékonyság, illetve károsodott alak következtében. A férfiak spermaképe világszerte romló tendenciát mutat, az elmúlt 50 évben több mint 50%-al csökkent az egészséges férfipopuláció átlagos spermaszáma. Megfelelő számú és minőségű spermium kialakulása esetén fertilitási problémát okozhat a spermiumok transzportjának károsodása is. A spermatermelés, érés és transzport problémájának oka lehet veleszületett rendellenesség, vagy kialakulhat később, valamilyen betegség (mint például varicocele, genitális és kiválasztórendszer fertőzése, endokrin-, immunológiai-, vagy obstrukcionális problémák, krónikus betegségek, tumorok) kapcsán, illetve életstílusbeli, vagy környezeti hatások, illetve genetikai faktorok (kromoszóma elváltozások, polimorfizmusok, vagy génmutációk) következtében.

Célkitűzések

Vizsgálataink célja volt a férfi nemzőképtelenség genetikai hátterének feltérképezése a vizsgálatokba bevont nemzőképtelen férfiak

- kromoszóma elváltozásainak elemzésével,
- normál kromoszóma polimorfizmusnak tekintett variációik és ezek gyakoriságának az egészséges populációban tapasztaltakkal való összevetésével, hogy a normális polimorfizmusnak tekintett kromoszóma variánsok lehetnek-e a csökkent nemzőképesség, vagy nemzőképtelenség okozói,
- az egyes polimorfizmusok együttes, illetve kromoszómális elváltozásokkal való előfordulási gyakorisága kapcsán az interkromoszómális hatások vizsgálatával,
- a kromoszómális elváltozások és polimorfizmusok, valamint a fenotípusos megjelenés közötti esetleges összefüggések feltárásával.

Vizsgált személyek és Módszerek

A vizsgálati személyek 2003 és 2006 között nagyrészt a Semmelweis Egyetem Urológiai Klinikájának Andrológiai szakambulanciáján, illetve más kórházakban, szakrendelőkben, magánorvosoknál 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 lévőknek eleget tettek (Klinikai Genetikai Szakmai Kollégium 2006). A szakmai protokollnak megfelelően olyan házaspárok férfi tagjait vontuk be a vizsgálatokba, akik azoospermiások, vagy súlyos oligozoospermiások, és meddőségüknek nincs fiziológiai magyarázata, illetve akik feleségének kórtörténetében többször abortált magzat szerepelt. E férfiak közül 60 jelentkező mesterséges megtermékenyítési eljárásra, és vállalta a genetikai vizsgálatokon való részvételt.

A rutin andrológiai vizsgálatok során két ondóvizsgálatra, a herezacskó ultrahangos vizsgálatára és hormonvizsgálatokra került sor. A citogenetikai vizsgálatokat a Semmelweis Egyetem Igazságügyi Orvostani Intézetének Humán-genetikai Laboratóriumában végeztük el. A nemzőképtelenség hátterében meghúzódó esetleges

kromoszómális okok tisztázása érdekében GTG, CBG, QFQ és NOR festési technikákat alkalmaztunk. A molekuláris citogenetikai vizsgálatok a Szegedi Biológiai Központ Genetikai Intézetében készültek. Az Y kromoszóma molekuláris genetikai vizsgálatára a wüzburgi Orvosi Laboratóriumban, valamint a budapesti Laborigo Molekuláris Genetikai Laboratóriumban került sor.

A Semmelweis Egyetem Igazságügyi Orvostani Intézetében folyó származás-megállapítási vizsgálatok jó alkalmat kínáltak arra is, hogy a meddő férfiak vizsgálati eredményeit összehasonlíthassuk 568, kontrollként használt, egészséges férfi eredményével.

Vizsgálataink statisztikai értékelése során a kromoszóma rendellenességek és polimorfizmusok abszolút és relatív előfordulási gyakoriságait elemeztük (χ^2 próbával) a kontroll csoporttal összehasonlítva.

Tudományos eredmények

A célkitűzésekben megfogalmazottakra válaszolva, eredményeinket a következőkben foglalhatjuk össze:

1. tézis: Kromoszóma elváltozások a nemzőképteleneknél

Vizsgálataink azt igazolták, hogy a kromoszómális elváltozásokkal magyarázható nemzőképtelenség hazai előfordulási gyakorisága az európai populációkban talált előfordulási gyakoriságokhoz hasonló.

– Vizsgálatink során leggyakrabban (8,3%) Klinefelter szindróma fordult elő, amely előfordulási gyakorisága nemzőképtelenek körében irodalmi adatok szerint 3–11%.

– Mintánkban magas előfordulási gyakorisággal találtunk (3,3%) extra Y kromoszómát, valamint az Y kromoszóma mikrodélációját.

A 47,XXX szindrómás férfiak az irodalmi adatok szerint általában fertilisek, előfordulási gyakorisága az átlag populációban 0,1%. A vizsgálati mintában szereplő férfiak rossz spermioqram eredménye (azoospermia illetve súlyos fokú oligozoospermia) egyéb káros tényezők befolyásoló hatása miatt alakulhatott ki.

Az Y kromoszóma mikrodélációjával kapcsolatos eredményeink azt támasztják alá, hogy a férfi vagy női fenotípusos megjelenést nem a mozaikos sejtek aránya, hanem a SRY gén hiánya vagy megléte okozza. Az alacsony termet kialakulásáért a GCY lókuszt deléciója, esetleg a SHOX gén dózis-hatása a felelős. A spermatogenezis hibája az AZF régió nagy részének hiányával, a 45,X sejtvonallal magas arányával, vagy ezek együttes jelenlétével magyarázható.

– Vizsgálati mintánkban a nemzőképtelenség kialakulásának hátterében autoszómák elváltozásait nem detektáltuk, ugyanakkor a kontroll csoportban 0,7%-ban talált t(22;Y), t(21;22), t(13;14), t(2;13) transzlokációk nem jártak együtt nemzőképtelenséggel. Mindezek alapján az állapítható meg – ellentétben az irodalmi adatokkal –, hogy ezek az elváltozások önmagukban nem, csak esetleg más hajlamosító tényezőkkel együtt okoznak nemzőképtelenséget, illetve, hogy az elváltozások pontosabb, molekuláris szintű elemzésére és a töréspont ismeretére van szükség ahhoz, hogy biztosan kimondhassuk, hogy adott személynél a nemzőképtelenséget a jelenlévő szerkezeti elváltozás okozta, egyes gének károsodása, kiesése miatt.

Összességében a nemzőképtelen vizsgálati mintánkban a kromoszómális elváltozások gyakorisága (15,0%) jóval nagyobb a kontroll csoporthoz képest (0,4%). Az átlag populáció esetén az irodalomban a kontroll csoporthoz hasonló (0,38%-os) előfordulási

gyakoriság szerepel, a nemzőképtelenek esetében a minta átlagos fertilitás csökkenésének mértékétől függően különböző adatokat találhatunk: a csökkent fertilitású férfiak körében 2%, oligospermiásoknál kb. 5%, azoospermiások között akár 10–15% vezethető vissza kromoszómális okokra. Vizsgálati mintánk ennek a kategóriának a felső határa körül van, a vizsgálati személyek azoospermiás túlsúlya miatt. Az elváltozások típusa is különbözött a két csoport között, a nemzőképteleneknél a nemi kromoszómák elváltozásai, a kontroll csoportban pedig autoszómális elváltozások voltak azonosíthatók.

2. tézis: Kromoszóma polimorfizmusok összehasonlító elemzése nemzőképtelen férfiak körében és az átlag populációban

– Az Y kromoszóma szélsőséges (nagyon nagy és nagyon kicsi) méreteinek előfordulási gyakorisága a várt értéknél nagyobb volt, így az extrém méretű Y kromoszóma összefüggésben állhat a nemzőképtelenség kialakulásával.

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

– Az 1, 9, 16-os autoszómák heterokromatin méreteinek polimorfizmus megoszlásában szignifikáns különbséget csak a 9-es kromoszóma esetén találtunk az egészséges és nemzőképtelen férfiak csoportja között.

– A 9-es kromoszómánál észlelt teljes pericentrikus inverziót a nemzőképtelen csoportban szignifikánsan nagyobb gyakorisággal találtuk meg a kontroll csoporthoz képest, vagyis a 9-es kromoszóma teljes pericentrikus inverziót hordozó férfiakban nagyobb eséllyel alakulnak ki fertilitási problémák az inverzió spermiumok morfológiáját, mozgékonyosságát és a meiotikus szegregációt módosító hatása miatt.

– Vizsgálati anyagunkban a 3-as, 4-es és akrocentrikus kromoszómák fluoreszcencia polimorfizmus eloszlását vizsgálva azt tapasztaltuk, hogy a 13-as, 14-es és 21-es kromoszómáknál mindkét vizsgált (centroméra közeli és szatellita) kromoszóma-szakasz esetén szignifikáns különbséget tapasztaltunk a nemzőképtelen és kontroll férfiak között.

– A szatelliták száma a nemzőképtelenek esetén szignifikánsan nagyobb gyakorisággal tért el a szokásos kettőtől, mint a kontroll csoportban. A szatelliták számbeli polimorfizmusa a 15-ös kromoszóma esetén volt a leggyakoribb variáció. A szatelliták száma és mérete valószínűleg a kromoszómák asszociációs képességén keresztül befolyásolja a nemzőképeséget, ez pedig a kromoszómák nagyobb törékenységével az akrocentrikus kromoszómák közötti robertsoni-transzlokációk esélyét növeli, illetve a meiotikus szegregáció károsításán keresztül aneuploidiát okozhat.

3. tézis: Interkromoszómális hatások vizsgálata

Az 1-es és 9-es kromoszómáknál előforduló heterokromatin szélsőséges méret (nagyon-kicsi, vagy nagyon-nagy) variációja, illetve a 9-es kromoszóma heterokromatin régiót érintő teljes pericentrikus inverzió gyakorisága szignifikánsan nagyobb volt a kromoszóma elváltozással (nemi kromoszóma aneuploidiával) rendelkezőknél, mint a teljes nemzőképtelen vizsgálati csoportban. A 9-es kromoszóma extrém méretű heterokromatin és pozícióbeli polimorfizmusai valószínűleg interkromoszómális hatásokon keresztül, a sejtek osztódását károsan befolyásolva megnövelhetik a kromoszóma elváltozások, elsősorban aneuploidiák kialakulásának valószínűségét.

4. tézis: Fenotípusos jegyek vizsgálata kromoszóma elváltozások és polimorfizmusok esetén

– Klinefelter szindrómás vizsgálati személyek különböző fenotípusos megjelenésének hátterében valószínűleg más gének kiegészítő hatásai állhatnak. Vizsgálataink szerint a

módosító tényezők közé tartozhatnak a testi kromoszómák heterokromatin régióját érintő polimorfizmusok is. Az Y kromoszóma heterokromatin variációja és az akrocentrikus kromoszómák rövid kar polimorfizmusai a fenotípusos megjelenést nem befolyásolták.

– A 47,XYY szindrómás betegek rossz spermogram eredménye a varicocele súlyosbító hatása mellett, valószínűleg más genetikai tényezők, például a 9-es kromoszóma heterokromatin pozícióbeli polimorfizmusa miatt alakulhatott ki.

– Mikrodeléciós Y kromoszómát hordozó személyek esetében a nemzőképesség csökkenésének mértékét egyértelműen a deléciós régió mérete, ezáltal a deletált gének száma és funkciója határozza meg. Emellett az Y kromoszómán található más gének kiesése egyéb fenotípusos elváltozást is okozhatnak, mint az alacsony termetet eredményező GCY növekedést kontrolláló gén kiesése, vagy a SHOX gének haploinsufficienciája.

– A kromoszóma polimorfizmusok és a fenotípus összefüggéseit a teljes nemzőképtelen csoportban vizsgálva a következő eredményekre jutottunk:

– Az Y kromoszóma heterokromatin méret és fluoreszcencia polimorfizmussal rendelkező személyeknél az obezitás, here elváltozás és gynecomastia nem fordult elő gyakrabban, mint a teljes vizsgálati csoportban.

– Az autoszómális extrém méretű heterokromatin polimorfizmussal és/vagy teljes inverzióval rendelkező személyek csoportjában minden vizsgált fenotípusos jegy esetében szignifikánsan nagyobb gyakorisággal találtunk rendellenességet, mint a teljes nemzőképtelen vizsgálati csoportban.

– A szatelliták számbeli és festődésbeli polimorfizmusával rendelkező személyeknél mindhárom fenotípusos bélyeget ritkábban tudtuk leírni a teljes vizsgálati csoporthoz képest.

Következtetések

A nemzőképtelen férfiak általános andrológiai vizsgálatai mellett a genetikai vizsgálatok szükségességét mutatja a vizsgálati anyagban tapasztalt nagyszámú genetikai elváltozás. Jogosan merül fel annak igénye is, hogy időben, pontosan diagnosztizálva az okokat, a betegeket megkíméljük a hosszadalmas és költséges vizsgálatoktól, esetleg felesleges műtéti beavatkozásoktól, gyógyszeres kezelésektől. A jól felvett anamnézis és az alapos kivizsgálás után, a pontos diagnózis ismeretében megtalálható a megfelelő kezelési, eljárási mód. A mikrodeléciót hordozó férfiaknál például az elváltozás kimutatásával nemcsak a nemzőképtelenség okára derülhet fény, így elkerülhetők lehetnek a további vizsgálatok, de a mikrodeléció elhelyezkedése és kiterjedtsége alapján előre jelezhető a heréből történő spermiumnyerés várható eredménye is. 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, akiknél a kiesés nagyobb területet is érinthet, mint édesapjuknál. A nemi kromoszóma elváltozást hordozó férfiak utódaiban pedig megnő a kockázata mind az autoszómális, mind a nemi kromoszómák rendellenességeinek.

A modern társadalmaknak az egészséghez, gyógyuláshoz való jog mellett a gyermekhez való jog elismerése is alapja kell, hogy legyen. A meddő párok gyermekhez segítése azonban egyéb, alapvető etikai kérdéseket is felvet. A nemzőképtelenség kezelésekor populáció szintű következményekkel is számolnunk kell, a populáció genetikai állományát ugyanis nagymértékben terheli a genetikai kontra-szelekció. Ez azt

jelenti, hogy az alacsony átlagos gyermekszám és a férfiak csökkenő spermaszáma mellett egyre gyakrabban veszik ki a részüket a gyermeknemzésből a szubfertilis férfiak, akik kitartó próbálkozással, vagy mesterséges megtermékenyítési eljárás segítségével mégiscsak utódokat nemzenek. A gyermekeknek tovább örökítve genetikai gyengeségüket, statisztikai értelemben csökkentik a következő generációk reprodukciós képességét.

*

Köszönetnyilvánítás: Különleges köszönettel tartozom mindenekelőtt témavezetőimnek, Prof. Dr. Bodzsár Évának és Mécsné Dr. Bujdosó Györgyinek, akik ötleteikkel és építő kritikáikkal hozzájárultak a dolgozat megírásához. Köszönettel tartozom ezen kívül azon intézményeknek, amelyek éltető közegei voltak munkámnak, így elsősorban az Eötvös Loránd Tudományegyetem Biológia Doktori Iskolájának és munkahelyemnek, a Magyar Tudományos Akadémia-Semmelweis Egyetem Igazságügyi Orvostani Intézetének. Szintén köszönet illeti a Magyar Tudományos Akadémia Szegedi Biológiai Kutatóközpont Genetikai Intézetét, a LabOrigo (Genodia) Molekuláris Diagnosztika Kft.-t, valamint az andrológiai szakambulanciákat, kiemelten a Semmelweis Egyetem Urológiai Klinikáját. A dolgozat nem készülhetett volna el a „Júlia” Kezdő Orvosok és Biológusok Megsegítésére Szolgáló Alapítvány támogatása nélkül.

Irodalom

Klinikai Genetikai Szakmai Kollégium (2006): Az Egészségügyi Minisztérium szakmai protokollja. *Reprodukciós elégtelenség genetikai kivizsgálása.* (Érvényesség: 2008. december 31.)

A szerzőnek publikációi az értekezés témakörében

- Bellovits, O. (2003): Genetical and epidemiological studies of polydactyly in Hungary. *Anthropologischer Anzeiger*, 61: 413–419.
- Bellovits, O. (2007): Sex chromosome abnormalities in azoospermic men. *Humanbiol. Budapest.*, 30: 185–190.
- Bellovits, O., Rusz, A., Csókay, B., Fodor, F., Csonka, E., Hadlaczky, Gy., Romics, I., Sótónyi, P., Bujdosó, Gy. (2006): Cytogenetic and molecular characterization of Y chromosome abnormalities coupled with infertility. European Human Genetics Conference, Amsterdam. *European Journal of Human Genetics*, 14: 191.
- Bellovits, O., Rusz, A., Romics, I., Csonka, E., Hadlaczky, Gy., Sótónyi, P., Bujdosó, Gy. (2006): Chromosomal aneuploidy in azoospermic men. *International Journal of Human Genetics*, 6: 171–176.
- Bellovits, O., Rusz, A., Romics, I., Csonka, E., Hadlaczky, Gy., Bujdosó, Gy., Sótónyi, P. (2006): Az azoospermia háttérében meghúzódó kromoszóma-eltérések. *Orvosi Hetilap*, 147: 531–535.
- Bellovits, O., Rusz, A., Romics, I., Csonka, E., Hadlaczky, Gy., Sótónyi, P., Bujdosó, Gy. (2005): Chromosomal disorders in patients with azoospermia. European Human Genetics Conference, Prága. *European Journal of Human Genetics*, 13: 95.
- Bellovits, O., Sótónyi, P., Bujdosó, Gy. (2006): The prevalence of the Klinefelter syndrome and its variants in a specific Hungarian infertile male group. *Anthropológiai Közlemények*, 47: 51–55.
- Bujdosó, Gy., Sótónyi, P., Bellovits, O., Arnold, J., Reinhold, J., Holló, Zs., Fodor, F. (2004): Common ancestor or not. Origin investigation. European Human Genetics Conference, Munich. *European Journal of Human Genetics*, 12: 307.
- Bujdosó, Gy., Sótónyi, P., Bellovits, O., Csonka, E., Hadlaczky, Gy. (2003): Inheritance of a balanced translocation through three generations. Proof of paternity. Fourth European Cytogenetics Conference, Bologna. *Annales de Génétique. International Journal of Human and Medical Genetics*, 2–3: 230–231.

- Bujdosó, Gy., Sótónyi, P., Bellovits, O., Csonka, E., Hadlaczký, Gy. (2003): Inherited instability of acrocentric chromosomes' short arm. Fourth European Cytogenetics Conference, Bologna. *Annales de Génétique. International Journal of Human and Medical Genetics*, 2–3: 270.
- Bujdosó, Gy., Sótónyi, P., Bellovits, O., Csonka, E., Hadlaczký, Gy. (2004): Translocation of chromosome 13 in the course of family investigation. 15th International Chromosome Conference, London. *Chromosome Research*, 12: 121–122.
- Décsey, K., Bellovits, O., Bujdosó, Gy. (2006): Human chromosomal polymorphism in a Hungarian sample. *International Journal of Human Genetics*, 6: 177–183.
- Magyar, L., Bellovits, O., Bujdosó, Gy. (2003): Néhány antropológiai mérőpont összehasonlító vizsgálata az Igazságügyi Orvostan 30 éves anyagából. III. Kárpát-medencei Biológiai Szimpózium, Budapest, 199–203.
- Magyar, L., Bellovits, O., Bujdosó, Gy. (2006): Changes in anthropometric data of the Hungarian child and adult population during the last thirty years based on family studies conducted by the Department of Forensic Medicine at Budapest. *Anthropologischer Anzeiger*, 64: 227–241.
- Pató, É., Kalocsai, G., Szócs, K., Bujdosó, Gy., Bellovits, O., Bajtai, A., Szalay, L. (2004): Benignus ovariumtumor Turner-szindrómában. A Magyar Belgyógyász Társaság XL. Nagygyűlése, Budapest. *Magyar Belorvosi Archívum. A Magyar Belgyógyász Társaság Lapja*, 2: 110.

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

