

Bir Klinefelter sendromu olgusunda mozaik karyotip

Mosaic karyotype in a case of Klinefelter syndrome

Işın Kaya¹, Y. Selma Ülker¹, Musa Saraçoğlu², Tuğba Kelez¹

¹Şifa Üniversitesi Tıp Fakültesi Bornova Sağlık Uygulama ve Araştırma, Genetik Tanı Merkezi-İzmir

²Şifa Üniversitesi Tıp Fakültesi Bornova Sağlık Uygulama ve Araştırma Üroloji-İzmir

Özet

Klinefelter Sendromu en sık rastlanılan seks kromozom anomalisidir. Klinefelter sendromu infertilitenin en sık genetik nedenleri arasındadır. İnfertilite olgularında olası kromozomal anöploidinin saptanması için kromozom analizi altın standarttır. Klinefelter Sendromu bulunan olguların yaklaşık %15'inde karyotip mozaiktir. Kromozomal olarak Klinefelter sendromu tanısı konulan olgularda mutlaka genetik danışma önerilmektedir. Kromozomal anöploidisi olan olgular modern üreme teknolojileri ile yardım alabilmektedirler. İnfertil olgumuzda olası kromozom anomalisi nedeniyle periferik kandan kromozom analizi yaptık. Karyotipi 47,XXY(82)/46,XX(16)/46,XY(2) olarak saptadık. Periferik kan ve deri fibroblast hücrelerinde FISH analizi yaparak mozaizim varlığını doğruladık

Anahtar Kelimeler: Klinefelter sendromu, infertilite, kromozom analizi, mozaizim, FISH.

Abstract

Klinefelter Syndrome is the most common sex chromosomal anomaly. Klinefelter syndrome is among the most common genetic causes of infertility. Chromosome analysis for the detection of possible chromosomal aneuploidy in cases of infertility is the gold standard. Approximately 15% of the patients with Klinefelter's syndrome have mosaic karyotype. In the cases that are diagnosed with chromosomal Klinefelter's syndrome, genetic consultancy is strictly recommended. Patients with chromosomal aneuploidy can receive help with modern reproductive technologies. We have made chromosome analysis from peripheral blood in our infertile case, because of chromosomal anomaly possibility. We have detected that the karyotype 47,XXY(82)/46,XX(16)/46,XY(2) We confirmed the presence of mosaicism in peripheral blood and skin fibroblast cells by FISH analysis.

Key Words: Klinefelter syndrome, infertility, chromosome analysis, mosaicism, FISH.

Geliş tarihi (Submitted): 07.11.2012

Kabul tarihi (Accepted): 10.03.2013

Yazışma / Correspondence

Yrd. Doç. Dr. Işın Kaya
Şifa Üniversitesi Tıp Fakültesi
Bornova Sağlık Uygulama ve
Araştırma Merkezi, İzmir Türkiye
E-mail: isintkaya@yahoo.com
Tel: 0505 272 47 47

Giriş

Olgumuz 38 yaşında primer infertilite olgusuydu. Üroloji kliniği tarafında kromozom analizi yapılmak üzere laboratuvarımıza yönlendirilen hastada yaptığımız periferik kandan kromozom analizi sonucunda kromozom kuruluşunu 47,XXY(%82)/46,XX(%16)/46,XY(%2) olarak saptadık. Ayrıca periferik kan kültürü hücrelerinde ve deri fibroblast hücre kültüründen elde edilen hücrelerde FISH analizi yaptık.

Gereç ve Yöntemler

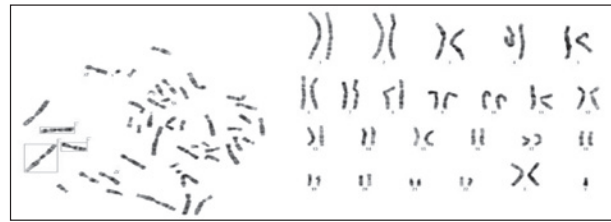
Periferik kan lenfositleri kullanılarak (PB max) 37°C de etüvde 72 saatlik hücre kültürü yapıldı. Kültürün son 2 saatinde 100 mikrolitre kolsemid uygulaması yapıldı. Santrifüj sonrası 37 C'de 35 dakika süreyle hipotonik solüsyonla muamele edildi. Fiksatif solüsyonuyla (1:3 oranında asetik asit:metanol) hücreler 3-4 kez muamele edildi ve sonra hazırlanan preparatlar tripsin giemsa bantlama yöntemi (GTG) ile boyandı. Analiz sonuçları International System For Human Cytogenetic Nomenclature (ISCN) 1995'e göre rapor edildi. Kromozom analizinde 100 metafaz analiz edildi.

Mozaiklik oranının daha fazla hücrede gösterilebilmesi ve farklı bir dokuda analiz için FISH tekniği kullanıldı. Farklı dokudan analiz yapabilmek için deri fibroblast kültürü yapıldı. Uzun süreli fibroblast kültürü için 3 ml besiyeri (PBmax-Gibco) ve 25 cm² kültür kapları kullanılarak hücreler 37 °C'de CO₂'li etüvde inkübe edildi. Harvest işleminden 2.5 saat önce 100 mikrolitre kolsemid (colcemid solution, Gibco) uygulaması yapıldı. Hücreler bu süre sonunda santrifüj edildi, süpernatant atıldıktan sonra 10 ml hipotonik solüsyon (0.075 mol/l KCl) eklendi ve 35 dakika 37 °C de bekletildi. Süre sonunda 1:3 oranında asetik asit:metanol ile hazırlanan fiksatif solüsyonu ile 3-4 kez muamele edildi. Lamaların üzerine hücrelerin damlatılarak yayılması ile hazırlanan preparatlarda FISH çalışması yapıldı. Taze hazırlanan preparat 2xSSC,%0.5 Igepal solüsyonunda (37 °C) 15 dakika bekletildi. %70, %85, %100'lük etanol'de 1'er dakika bekletilerek dehidratasyon yapıldı ve preparat oda ısısında kurutuldu. 10 µl(SE X(DXZ1/Y (DYZ3), Poseidon Satellite Enumeration Probes) prob damlatılarak 22 mm²lik lamelle kapatıldı. Ruber cement ile lamelin etrafı kaplandı. Thermobrite ile 75°C de 5 dk denatürasyon ardından bir gece boyunca hibridizasyon yapıldı. Hibridizasyon

sonrası yıkama işleminde önce preparat üzerindeki ruber cement kaldırıldı. Preparat sırasıyla 2xSSC /% 0.1 ige-pal (oda ısısında 2 dakika), 2xSSC /%0.3 İgepal (72 °C 2 dakika), 2xSSC /% 0.1 ige-pal (oda ısısında 1 dakika) solüsyonunda yıkandı. %70, %85 ve %100 etanol'de 1'er dakika bekletilerek dehidratasyon yapıldı. Preparat oda ısısında kurutuldu. DAPI/ Antifade uygulandı ve floresan mikroskop ile analiz yapıldı..

Bulgular

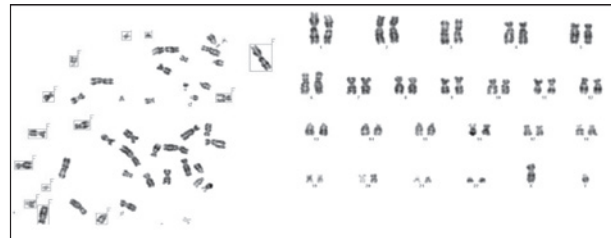
Periferik kan kısa süreli hücre kültürü sonucunda 100 metafaz plağı analiz edildi. 47,XXY(82)/46,XX(16)/46,XY(2) kromozom kuruluşu saptandı (şekil1,2,3). Mozaizm oranı 47,XXY(%82)/46,XX(%16)/46,XY(%2) olarak belirlendi.



Şekil 1: Periferik kan karyotip analizinde 47,XXY kromozom kuruluşu

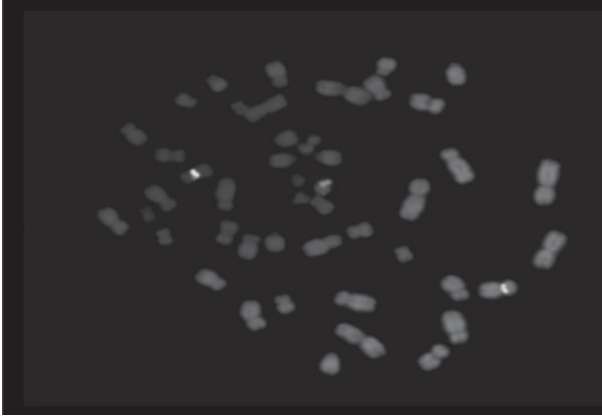


Şekil 2: Periferik kan karyotip analizinde 46,XX kromozom kuruluşu

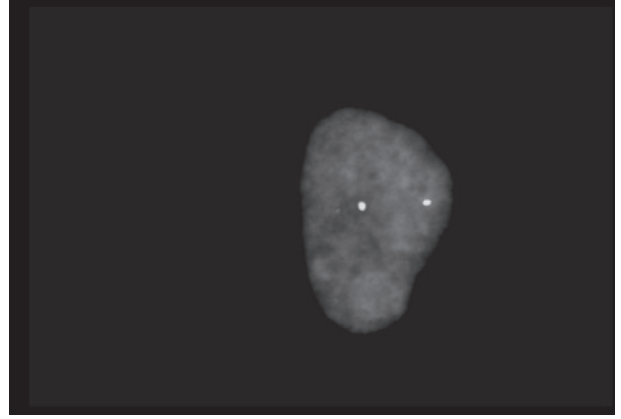


Şekil 3: Periferik kan karyotip analizinde 46,XY kromozom kuruluşu

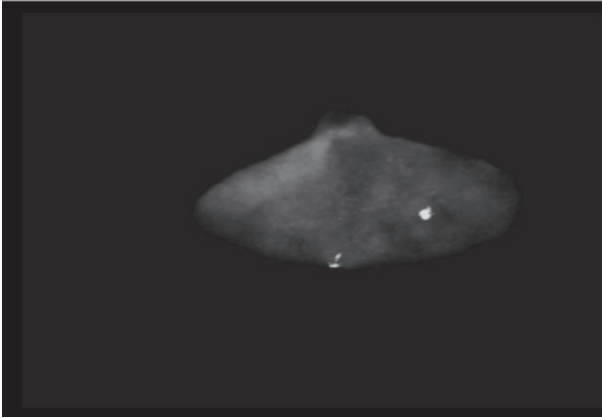
Mozaiklik oranının daha fazla hücrede analiz yapılarak ortaya konabilmesi amacıyla periferik kan lenfosit kültürüne uygulanan Floresans in situ Hibridizasyon (FISH) çalışmasında interfaz hücresi ve metafaz plağı toplam 550 hücre analiz edildi. FISH analizi sonucunda oran XXY(%94.3)/XX(%4.7)/XY(%0.72)/XXXXY(%0,18)



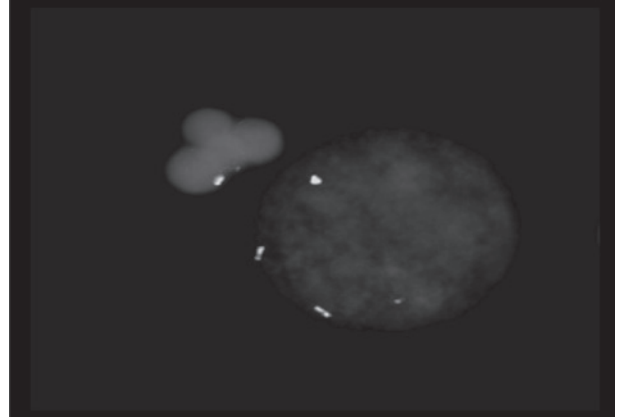
Şekil 4: Periferik kanda FISH analizi ile XXXY varlığı. X kromozomuna ait iki adet sinyal (yeşil), Y kromozomuna ait tek adet sinyal (kırmızı)



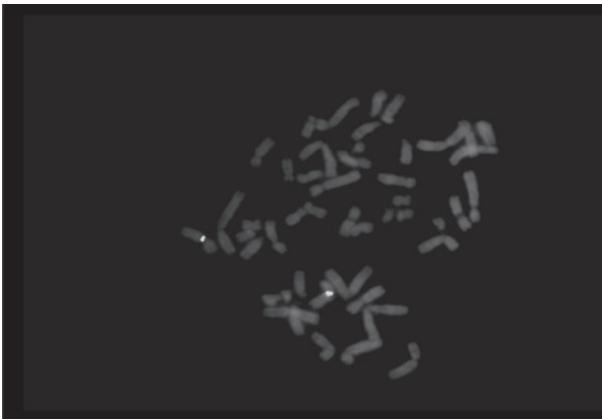
Şekil 7: Deri fibroblast kültüründe FISH analizi ile XX varlığı. X kromozomuna ait iki adet sinyal (yeşil)



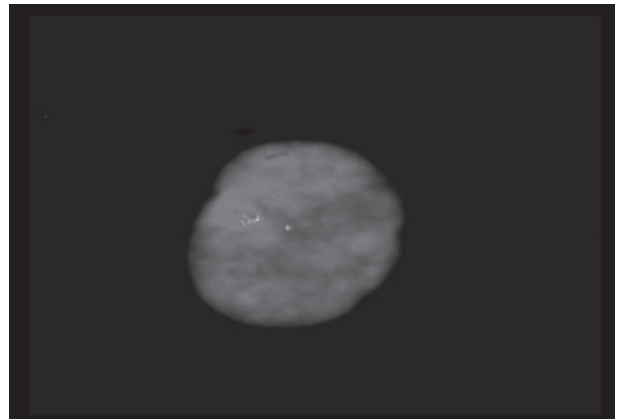
Şekil 5: Periferik kanda FISH analizi ile XX varlığı. X kromozomuna ait iki adet sinyal (yeşil)



Şekil 8: Deri fibroblast kültüründe FISH analizi ile XXXY varlığı. X kromozomuna ait iki adet sinyal (yeşil), Y kromozomuna ait bir adet sinyal (kırmızı)



Şekil 6: Periferik kanda FISH analizi ile XY varlığı (Solda üstteki hücre).X kromozomuna ait bir adet sinyal (yeşil),Y kromozomuna ait bir adet sinyal (kırmızı) Periferik kanda FISH analizi ile XXXY varlığı (Sağ alttaki hücre) X kromozomuna ait üç adet sinyal (yeşil),Y kromozomuna ait bir adet sinyal (kırmızı)



Şekil 9: Deri fibroblast kültüründe FISH analizi ile XY varlığı. X kromozomuna ait bir adet sinyal (yeşil), Y kromozomuna ait bir adet sinyal (kırmızı)

olarak bulundu (şekil 4,5,6).

Mozaik kromozom kuruluşunun başka bir dokuda gösterilebilmesi amacıyla da hastaya ait deri fibroblast kültüründe Fluoresans in situ Hibridizasyon (FISH) çalışması yapıldı. Deri fibroblast kültüründen elde edilen hücrelerin FISH çalışmasında toplam 71 hücre analiz edildi. Bu dokuya ait oran XXY (%93) / XX(%5.6)/ XY(%1.4) olarak saptandı (Şekil 7,8,9).

Tartışma

Azospermi, infertil erkeklerin %8'inde görülen ejakulatta komple sperm yokluğudur⁴. Azospermi obstrüktif ve nonobstrüktif nedeni olabilir^{2,4}. Nonobstrüktif azospermide öncelikle genetik araştırma gereklidir⁴. XXY anöploidisi insanda en sık rastlanılan seks kromozom bozukluğudur²³

Klinefelter sendromu infertilitenin en sık genetik nedenleri arasındadır. Klinefelter sendromu azospermik erkeklerin %11'inde, infertil erkeklerin %4'ünde görülmektedir²⁴. Klinefelter Sendromu bulunan vakaların yaklaşık %15'inde karyotip mozaiktir¹⁹.

Bizim olgumuzda azospermi mevcuttu. Hastada olası kromozomal anöploidi şüphesi nedeniyle hastanın periferik kan örneğinden gerçekleştirilen kromozom analizinde 100 metafaz plağı analiz ettik ve 82 metafaz plağında 47,XXY, 16 metafaz plağında 47,XXY, 16 metafaz plağında 46,XX ve 2 metafaz plağında 46,XY kromozom kuruluşu tespit ettik. Mozaik oranını 47,XXY(%82)/46,XX(%16)/46,XY(%2) olarak belirledik. Mark H.F.L. ve ark. 1999 yılında mozaik kromozom kuruluşuna sahip Klinefelter sendromlu bir olguda periferik kandan kromozom analizi ile 47,XXY(%58.6) /46,XX(%41.4) oranını tespit etmişler. Aynı hastada yapılan FISH analizi ile XXY((59.5)/XX(%35.2)/XY(%5.3) oranını saptamışlar. Biz olgumuzda periferik kan FISH analizi ile anöploidi oranını XXY(%94.3)/XX (%4.7)/XY(%0.72)/XXXY(%0,18) olarak bulduk. Konvensiyonel sitogenetik analizde saptanmayan XXXY yapısında tek hücreye rastlanıldı.

Ayrıca mozaik yapının konfirmasyonu amacıyla farklı bir doku örneği olarak kullandığımız deri fibroblast hücre kültüründe yaptığımız FISH analizi ile de 71 hücrenin incelemesi sonucunda XXY (%93)/XX(%5.6)/XY(%1.4) mozaik oranına ulaştık. Deri fibroblast kültüründe XXXY yapısında hücreye rastlamadık. Bunun az sayıda

hücre analiz edebilmemiz nedeniyle olabileceğini düşündük.

Olgumuzda mozaik kromozom kuruluşunda ana hücre dizisinin XXY olduğunu, XX ve XY hücrelerin XXY hücrelerden derive olduğunu düşündük. HFL Mark ve ark. (1999) mozaik karyotipe sahip olgularında da aynı sonuca varmışlar.¹³ Çünkü XX ana hücre dizisinden XXY hücrelerin oluşması mümkün değildir. XY hücrelerden XXY oranından fazladır. Bu nedenle ana hücre dizisinin XXY olduğunu düşündük.

Mozaik olmayan Klinefelter sendromlu olgularda %90 oranından fazla azospermi görülmektedir. Ferlin A ve ark. kendi serilerinde bu oranı % 76.6 olarak tespit etmişler.⁵ Mozaik olgularda değişken sayıda sperm üretimi olabilmektedir. Ferlin A. ve ark. kendi serilerinde mozaik olgularda azospermi oranını %74.4 olarak tespit etmişler.⁵

Klinefelter sendromu olgularında nadiren çok az oranda spermatogeneze rastlanılmaktadır ve bu olguların çok nadiren spontan olarak çocuk sahibi olabildikleri rapor edilmiştir^{10,19} ICSI tekniğinin gelişmesinden önce bu hastaların büyük çoğunluğu fertilitate bakımından umutsuzdu. ICSI ejakulatta sperm bulunmadığı sadece testiste sperm bulunduğu durumlarda bile bu hastalarda üreme fırsatı sağlanmaktadır⁹.

Intrastoplazmik sperm enjeksiyonu (ICSI) ilk kez Palermo ve arkadaşları tarafından 1992 yılında uygulanmış, erkeğe bağlı infertilitesi olan ve daha önce tedavi edilemeyen birçok çiftte tedavi olanağı sağlamıştır.¹⁵

1996 yılında Tournaye ve ark. tarafından Klinefelter sendromlu azospermik bir olgudan testiküler sperm ekstraksiyonuyla (TESE) spermatozoa elde edildiği rapor edilmiştir.²¹ Günümüzde ICSI Klinefelter sendromlu hastalarda başarıyla uygulanabilmektedir.^{1,3,9} Birçok araştırmada mozaik olmayan Klinefelter olgularında TESE ve ICSI yöntemi ile bir çok sağlıklı çocuk doğumu rapor edilmiştir.^{2,9,17,24} Mozaik karyotipe sahip olgularda da aynı yöntemle başarılı sonuçlar elde edilmiştir.¹⁷

Biz olgumuzu yardımcı üreme teknikleri ile yardım alabilmesi için bir merkeze yönlendik.

Sonuç olarak infertilite yükü olan bireylerde öncelikle periferik kan örneğinden karyotip analizi yapılarak varsa anöploidinin saptanması gerekmektedir. Klinefelter sendromlu olgulara sahip oldukları kromozomal bozuk-

luk hakkında ve yardımcı üreme teknikleri konusunda bilgilendirilmelidirler. Bu olgulara yardımcı üreme teknikleri ile çocuk sahibi olabilmek şansı varlığında sahip olabilecekleri çocuğun kromozomal kuruluşundaki olası riskler konusunda da mutlaka genetik danışma önerilmelidir.

Kaynaklar

1. Akashi T, Fuse H, Kojima Y, Hayashi M and Honda S: Birth after intracytoplasmic sperm injection of ejaculated spermatozoa from a man with mosaic Klinefelter's syndrome. *Asian J Androl* 2005;7(2):217-220.
2. Bergère M, Wainer R, Nataf V, Bailly M, Gombault M, Ville Y, Selva J: Biopsied testis cells of four 47,XXY patients: fluorescence in-situ hybridization and ICSI results. *2002;17(1):32-37.*
3. Bhasin Shalender. Approach to the Infertile Man. *J Clin Endocrinol Metab* 2007;92:1995-2004.
4. Brugh VM, Lipshultz LI: Male factor infertility Evaluation and management. *Med Clin N Am* 2004 88:367-385.
5. Ferlin A, Arredi B, Foresta C. Genetic causes of male infertility. *Reproductive Toxicology* 2006;22:133-141.
6. Jacobs PA, Strong JA. A case of human intersexuality having a possible XXY sex-determining mechanism. *Nature* 1959;183:302-303.
7. Jones LK: Smith's Recognizable Patterns of Human Malformation. Elsevier Saunders. Philadelphia. 2006;68-69.
8. Klinefelter HF, Reifenstein EC, Albright F. Syndrome characterized by gynecomastia, aspermatogenesis without Leydigism, increased excretion of follicle stimulating hormone. *J Clin Endocrinol* 1942;2:615-627.
9. Lanfranco F, Kamischke A, Zitzmann M, Nieschlag E: Klinefelter's syndrome. *Lancet* 2004;364:273-83.
10. Laron Z, Dickerman Z, Zamir R, Galatzer A. Paternity in Klinefelter's Syndrome—A Case Report 1982;8(2): 149-151.
11. Lee J.Y, Dada R, Sabanegh E, Carpi A, Agarwai A: Infertility 2011;77:598-601.
12. Lenz P, Luetjens CM, Kamischke A, Kühnert B, Kennerknecht I and Nieschlag E: Mosaic Status in lymphocytes of infertile men with or without Klinefelter syndrome. *Hum Reprod* 2005;20:1248-1255.
13. Mark H.F.L, Bai H, Sotomayor E, Mark S, Zolnierz K, Airall E, Sigman M: A Variant Klinefelter Syndrome Patient with an XXY/XX/XY Karyotype Studied by GTG-Banding and Fluorescence in Situ Hybridization. *Experimental and Molecular Pathology* 1999;67:50-56.
14. Okada H, Fujioka H, Tatsumi N, Kanzaki M, Okuda Y, Fujisawa M, Hazama M, Matsumoto O, Gohji K, Arakawa S and Kamidono S: Klinefelter's syndrome in the male infertility clinic. *Hum reprod* 1999;14:946-952.
15. Palermo G, Joris H, Devroey P, Van Steirteghem AC. Pregnancies after intracytoplasmic injection of single spermatozoon into an oocyte. *Lancet* 1992;340(8810):17-18.
16. Schiff JD, Palermo GD, Veeck LL, Godstein M, Rosenwaks Z and Schlegel PN: Success of Testicular Sperm Injection and Intracytoplasmic Sperm Injection in men with Klinefelter Syndrome. *J Clin Endocrinol Metab* 2005;90(11):6263-6267.
17. Seo JT, Park YS, Lee JS. Successful testicular sperm extraction in Korean Klinefelter syndrome. *Urology* 2004;64:1208-1211.
18. Smyth CM and Bremner WJ: Klinefelter Syndrome. *Arch Intern Med.* 1998;158:1309-1314.
19. Terzoli G, Lattata F, Lobbiani A. Fertility in a 47,XXY patient: assessment of biological paternity by deoxyribonucleic acid fingerprinting. *Fertil Steril* 1992;58:821-22.
20. Thompson and Thompson. *Genetics in Medicine.* Sixth Ed Philadelphia. 2000;157-179.
21. Tournaye H, Staessen C, Liebaers I, Assche E.V, Devroey P, Bounduelle M, Steirteghem A.V: Testicular sperm recovery in nine 47,XXY Klinefelter patients: *Human Reproduction* 1996; 11(8): 1644-1649.
22. Velissariou V, Christopoulou S, Karadimas C, Pihos I, Kanaka-Gantenbein C, Kapranos N, Kallipolitis G and Hatzaki A : Rare XXY/XX mosaicism in a phenotypic male with Klinefelter syndrome: case report. *Eur. J. Med. Genet.* 2006;49:331-337.
23. Visootsak J and Graham Jr JM: Klinefelter syndrome and other sex chromosomal aneuploidies. *Orphanet Journal of Rare Disease* 2006;1:42.
24. Wikström A.M, Dunkel L: Klinefelter syndrome. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab.* 2011;25:239-250.