الأسباب الوراثية الكامنة وراء العقم مجهول السبب عند الرجال في سورية

غالية أبو الشامات[1] و محيي الدين عيسى[1] و مروان حلبي[2]
[1] قسم علم الحياة– كلية العلوم – جامعة دمشق– سورية
[2] قسم النسج والتشريح والجنين– كلية الطب – جامعة دمشق– سورية

تاريخ الإيداع 2010/03/07
قبل للنشر في 2010/06/28

الملخص

قمنا بتقصيّ الأسباب الوراثية المؤدية إلى العقم مجهول السبب عند الرجال في سورية عن طريق تحديد أنماط الشذوذات الصبغيّة والحذوف الدقيقة (Microdeletions) في الموقع AZF(Azoospermic factor) من الصبغي Y الشائعة في المجتمع السوري، ودراستها على المستويين الخلوي والجزيئي وهي دراسة تجرى أول مرة في سورية. درسنا النمط النووي (Karotype) عند 261 مريضاً يعانون من حالة انعدام النطاف في السائل المنوي (Azoospermia)، فظهرت لدينا 72 حالة شذوذ صبغي بنسبة (27.6 %) كان معظمها لتغيرات صبغية عددية، شكلت متلازمة كلاينفيلتير (Klinefelter syndrome، 47,XXY) النسبة الكبرى منها (23.4%). كما ظهرت بعض الحالات النادرة والأقل تكراراً كحالة الذكر XX. درسنا الحذف الدقيق في الموقع AZF من الصبغي Y عند 121 مريضاً، فوجدنا 15 حالة حذف بنسبة (12.4%) امتاز العدد الأكبر منها (7 حالات) بوجود الحذف في الموضع AZFa. مما يدل أن الشذوذات الصبغية والحذوف الدقيقة في الموقع AZF من الصبغي Y مسؤولة عن إخفاق عملية تشكل النطاف ومن ثمّ العقم، وهي شائعة في مجتمعنا الأمر الذي يستوجب إجراء تحاليل وراثية للأزواج وخاصةً الراغبين بالاستفادة من التقانات المساعدة على الإنجاب، مع تقديم استشارة وراثية شاملة لهم تشرح نمط الخلل الوراثي وطبيعته والأخطار الناجمة عن انتقال هذا الخلل إلى الأبناء.

الكلمات المفتاحية: العقم مجهول السبب، انعدام النطاف، الشذوذات الصبغية، الحذوف الدقيقة.

Genetic causes of idiopathic male infertility in Syrian men

G. Abou Alchamat[(1)]; M. Esa[(1)] and M. Alhalabi[(2)]

[(1)] Department of Biology, Faculty of Sciences, Damascus University, Syria
[(2)] Department of Histology and Emberyology, Faculty of Medicen, Damascus University, Syria.

Received 07/03/2010
Accepted 28/06/2010

ABSTRACT

The aim of this study is to investigate the genetic causes of idiopathic infertility in Syrian men, by identifying the types of chromosomal abnormalities and Microdeletions of the AZF region on the Y chromosome, that are widespread in Syrian society and studying it Cytogenetically and molecularly ;a study which were carried out for the first time in Syria. Karyotype was done to a group of 261 azoospermic patients, chromosomal abnormalities were detected in 72 cases (27.6%) mostly for numerical chromosomal abnormalities, in which Klinefelter syndrome (47, XXY) formed the largest proportion (23.4%). Some rare less frequent cases were also detected, like the case of XX male. Microdeletions of the AZF region on the Y chromosome were studied for a group of 121 patients, of which 15 microdeletion cases were found (12.4%). Notably the largest number of deletions were for deletions in the AZFa region (7 cases). We concluded that, chromosomal abnormalities and Microdeletions of the AZF region at the Y chromosome are responsible for spermatogenesis failure and thus causing infertility, and such defects exist in our society. We emphasize also, the need for genetic tests to all couples seeking reproductive assistance, and the essential of genetic counseling to explain the type and nature of abnormalities and the risks of transmitting this type of abnormalities to offspring.

Key words: Idiopathic infertility, Azoospermia, Chromosomal abnormalities, Microdeletions

المقدمة

يُعرّف العقم (infertility) عند الإنسان بعدم الحمل والإنجاب بعد مرور عام أو أكثر على الزواج. ويعود في 30% من حالاته إلى العقم الذكري (Male infertility) [1] الذي يتجلى في معظم الحالات، بفشل تشكل النطاف (Spermatogenic failure) وعدم ظهورها في السائل المنوي وتُعْرف باسم حالة انعدام النطاف (Azoospermia). يُعتقد أن هناك عوامل وراثية تسبب غياب النطاف الكلي غير انسدادي المنشأ (non-obstructive Azoospermia) [2]، مثل الشذوذات الصبغية (chromosomal abnormalities) أو الطفرات على مستوى الـ DNA[3]. فوجود الشذوذ الصبغي يؤدي إلى تعطيل سيرورة عملية تشكل النطاف بسبب الاضطراب الذي يحدثه في أثناء الازدواج الصبغي (chromosome pairing) أو في أثناء تشكل مغزل الانقسام مما يسبب إعاقة هجرة الصبغيات إلى قطبي الخلية، ومن ثمّ توقف في عملية تشكل النطاف (spermatogenic arrest) [4]. كما يؤدي الحذف الدقيق في الموقع AZF من الصبغي Y إلى انعدام النطاف في 13– 20% من الحالات. ويدعى هذا الموقع بعامل انعدام النطاف (Azoospermic factor) نظراً إلى اشتماله على العديد من المورثات ذات الصلة بتشكل النطاف وإنّ تعرّض أيّ من تلك المورثات إلى الحذف أو إعادة الترتيب يؤدي إلى فشل في عملية تشكل النطاف ومن ثمّ العقم [5]. هدفت هذه الدراسة إلى كشف الطفرات والشذوذات الصبغية المؤدية إلى العقم الشائعة بين الرجال في سورية، ودراستها وتحديد أنماطها وأسبابها على المستويين الوراثي الخلوي والجزيئي.

مواد البحث وطرائقه

عينة الدراسة وطرائق دراستها

تألفت عينة الدراسة من 261 مريضاً يعانون من حالة انعدام النطاف في السائل المنوي غير انسدادي المنشأ، تراوحت أعمارهم بين 22– 58 عاماً، درسنا النمط النووي (Karyotype) على عينات مأخوذة من الدم المحيطي للمرضى جميعهم عن طريق الدراسة الوراثية الخلوية (Cytogenetics)، وفقاً للطريقة النموذجية المتبعة في تحضير المحضرات الصبغية، وتقانة التعصيب التربسيني (GTG-banding) [6]. اتبعنا مصطلحات(ISCN, 2005) كدليل في كتابة النتائج [7].

تطلبت أربع حالات المزيد من الدراسة لتأكيد نتيجة الدراسة الوراثية الخلوية لذا لجأنا لاستخدام طريقة تألق التهجين في الموضع (FISH، Fluorescence In Situ Hybridization)، حيث استخدمنا مسابير (probes) خاصة ونوعية بكل حالة من الحالات.

انتخبنا 121 حالة للدراسة الجزيئية والكشف عن الحذف الدقيق (Microdeletion)

في الموقع AZF من الصبغي Yبطريقة التفاعل السلسلي للبوليميراز المتعدد (PCR multiplex)باستخدام11موقعاً واسماً للتسلسل (Sequence-tagged sites, STS)، خاصاً بمورثات الموقع AZF المسؤولة عن تشكل النطاف، هذه المواقع هي: (sY84,sY86,USP9Y,DBY) في الموضع AZFa و(sY117,sY125,sY127,sY134) في الموضع AZFb و(sY254, sY255) في الموضع AZFc وsY95 لمنطقة الكروماتين المتغاير (heterochromatin region) فضلاً عن شاهد داخلي (internal control) من المورثة المحددة للجنس (sex-determining region of the Y chromosome, *SRY*) والمورثة *ZFY*.

النتائج

1- نتائج الدراسة الوراثية الخلوية

درسنا النمط النووي عند 261 مريضاً يعانون من حالة انعدام النطاف في السائل المنوي لتحري الشذوذات الصبغية المحتملة والتي يمكن أن تكون سبباً في العقم، فظهرت لدينا 72 حالة شذوذ صبغي بنسبة (27.6%) كان معظمها لشذوذات صبغية عددية (65 حالة)، شكلت متلازمة كلاينفيلتير 47,XXY النسبة الكبرى منها (61 حالة). أما الشذوذات الصبغية الباقية فكانت: حالتان لشذوذات عددية بنيوية وأربع حالات لشذوذات بنيوية، كما ظهرت لدينا حالة واحدة نادرة وهي حالة الذكر XX (46,XX) في حين بدت الحالات الباقية (189 حالة) سوية النمط النووي 46, XY.

يلخص الجدول (1) أنماط وتواتر الشذوذات الصبغية التي وجدناها في دراستنا.

الجدول (1) أنماط وتواتر الشذوذات الصبغية المسجلة في عينة الدراسة.

أنماط الشذوذات الصبغية	عدد الحالات	التواتر
الشذوذات الصبغيّة العددية	**65**	**% 25**
47,XXY	61	%23.4
47,XXY/46,XY	3	%1.14
47,XYY	1	%0.38
الشذوذات الصبغيّة العددية البنيويّة	**2**	**% 0.76**
45,X/46,X,der(Y)	1	%0.38
47,XXY,add(16)(q24)	1	%0.38
الشذوذات الصبغيّة البنيويّة	**4**	**%1.5**
45,XY t(14;15)(q10;q10)	1	%0.38
46,Y ,t(X;9)(p22.2;q31)	2	%0.76
46,X,der(Y)(q12)	1	%0.38
حالات أخرى		
حالة الذكر XX	**1**	%0.38
العدد الإجمالي	**72**	**% 27.6**

2- نتائج تألق التهجين في الموضع

(Fluorescence In Situ Hybridization، FISH):

درسنا الحالات التالية بطريقة تألق التهجين في الموضع:

أ- حالة الانتقال الصبغي المتبادل (p22.2;q31) t(X;9), 46,Y

تعود هذه الحالة لأخوين عقيمين تبين بنتيجة دراسة نمطهما النووي أنهما يحملان انتقالاً صبغياً بين الصبغي الجنسي X وأحد الصبغيين الجسميين 9، وقد ورثا هذا الانتقال عن أمهما الحاملة للانتقال ذاته. وللتحقق من هذه النتيجة طبقنا تقانة تألق التهجين في الموضع (FISH) على محضرات صبغية من كلا الأخوين باستخدام مسبار نوعي خاص بالصبغي رقم9 موسوم بصباغ يتألق باللون الأخضر(Fluorescein isothiocyanate, FITC) (Chromosome paint XCP9 Meta System GMBH) وآخر نوعي وخاص بالصبغي X موسوم بصباغ يتألق باللون الأحمر (Texas Red) (Chromosome paint XCPX Meta System GMBH). أكدت دراسة المحضرات النتيجة التي حصلنا عليها بالدراسة الوراثية الخلوية، إذ لاحظنا تألقاً باللون الأخضر على الصبغي X المتألق باللون الأحمر، كما لاحظنا تألقاً باللون الأحمر على أحد الصبغيين 9 والمتألقين باللون الأخضر، مما يؤكد النتيجة التي توصلنا إليها، بذلك تكون الصيغة الصبغية لهذين الأخوين بحسب ISCN (2005) هي:

46 ,Y, t(X;9)(p22.2;q31) ish der(9)(wcpX+);der(X)(wcp9+)

ب- حالة الحذف على الصبغي الجنسي Y 46, X, der (Y) (q12)

أظهرت دراسة النمط النووي لهذه الحالة وجود حذف كبير على الذراع الطويل من الصبغي Y، وللتحقق استخدمنا المسابير النوعيّة الخاصة بالصبغي Y فضلاً عن المسابير النوعية الخاصة بالصبغي X كشاهد، حيث وسمنا الأجزاء الانتهائية (Telomeres) على الذراع القصير (p) من كلا الصبغيين X و Y باستخدام المسبار (DXYS130XYpter, Red Q-BIOgene®) والأجزاء الانتهائية على الذراع الطويل(q) من الصبغيين Xو Y باستخدام المسبار (DXYS224XY qter,Green, Q-BIOgene®)، كما وسمنا منطقة المورثة *SRY* الواقعة على الذراع القصير من الصبغيY في الموقع (Yp11.3) باستخدام مسبار خاص ونوعي بتلك المورثة يتألق باللون الأحمر ™(SpectrumOrange Vysis)، ووسمنا منطقة الجزء المركزي (Centromere) من الصبغيين X و Y باستخدام المسبار (DYZ 3) واستخدمنا المسبار (DYZ1 Yqh Direct Red, Q-BIOgene ®) لوسم منطقة الكروماتين المتغاير على الصبغيY، كما استخدمنا مسباراً خاصاً لوسم كامل الصبغي Y (Whole painting chromosome , WPC) (XCPY Meta System GMBH).

وبالنتيجة ظهرت الإشارات (signals) الخاصة بكل تلك المسابير، عدا الإشارة الخاصة بالمسبار التابع لمنطقة الكروماتين المغاير مما يدل على وجود حذف شمل هذه المنطقة من الصبغي، لم تظهر أيضاً الإشارة الخاصة بالمسبار الواسم للأجزاء الانتهائية على الذراع الطويل، بل ظهرت عوضاً عنها الإشارة الخاصة بالمسبار الواسم للأجزاء الانتهائية على الذراع القصير، كما أن استخدام المسبار الواسم لكامل الصبغي أعطى إشارة واحدة مما ينفي حالة الانتقال. وبذلك يمكن كتابة الصيغة الصبغية لهذا المريض بالاعتماد على هذه النتيجة وبحسب (ISCN 2005) كالآتي:

46,X,del(Y).ish del(Y)(DXYS130++, SRY+, DYZ3+, DYZ1-, DXYS224-)

ت- حالة الذكر XX:

أظهرت دراسة 50 انقساماً خلوياً أن هذه الحالة تحمل التركيب XX ولا دليل لوجود أي انتقال صبغي أو حالة موزائيك. وللكشف عن احتمال وجود المورثة *SRY* الواقعة على الذراع القصير من الصبغي Y (Yp11.3) والتي ربما تكون قد انتقلت إلى أحد الصبغيين X أو إلى أحد الصبغيات الجسمية كما هو شائع في مثل تلك الحالات، استخدمنا المسبار (LSI SRY SO/ CEP X SG dual color Vysis®) الذي يتفلور باللون الأحمر عند وجود المورثة *SRY* ، ويحوي شاهداً داخلياً (DXZ1)، يتفلور باللون الأخضر ويقع في منطقة الجزء المركزي الخاصة بالصبغي X في الموقع Xp11.1-q11.1. فظهرت إشارتان خضراوان تعودان لمنطقة الجزء المركزي على الصبغيين X، ولم تظهر أية إشارة حمراء دليل أن هذه الحالة هي من الحالات النادرة التي تظهر بالتركيب **XX** مع فقدان وجود المورثة *SRY*.

3-نتائج الدراسة الوراثية الجزيئية

الكشف عن الحذف الدقيق Microdeletion **في الموقع** AZF **من الصبغي** Y

درسنا الحذف الدقيق في الموقع AZF من الصبغيY عند 121 مريضاً، حيث أبدى (119) مريضاً منهم نمطاً نووياً سوياً أما الحالتان الباقيتان فكانتا لشذوذات بنيوية على الصبغي Y، وهما الحالة 46,X,der(Y)(q11.2) وَ الحالة(Y)mos45,X \ 46,Xder. استخدمنا 11 موقعاً واسماً للتسلسل(STS) للكشف عن الحذوف الدقيقة في الموقع AZF؛ وهذه المواقع الـ 11 خاصة بمورثات الموقع AZF والمسؤولة عن تشكل النطاف، وتبين وجود الحذف في 15 حالة فقط بنسبة (12.4%). تميزت حالتان بحذف لكامل الموقع AZF و7 حالات بوجود الحذف في الموضع AZFa. ويوضح الجدول (2) النتائج التي حصلنا عليها.

الجدول (2) نتائج الكشف عن الحذوف الدقيقة في الموقع AZF من الصبغي Y

الحالة	النمط النووي	منطقة الحذف الدقيق	STS المحذوفة
1	46,XY	ضمن AZFa	DBY
2	46,XY	AZFb	sY117 sY125 sY127 sY134
3	46,XY	AZFc	sY254 sY255
4	46,XY	AZFb+ AZFc	sY117 sY125 sY127 sY134 sY254 sY255
5	46,XY	AZFc	sY254 sY255
6	46,XY	ضمن AZFa	DBY
7	46,XY	ضمن AZFa	DBY USP9Y
8	46,XY	AZFc	sY254 sY255
9	46,XY	ضمن AZFa	DBY
10	46,XY	AZFc	sY254 sY255
11	46,XY	ضمن AZFa	DBY USP9Y
12	46,X,der(Y)(q11.2)	AZFb+AZFc+ AZFa	DBY USP9Y sY125 sY127 sY254 sY255
13	mos45,X\46,Xder (Y)	AZFb+AZFc+ AZFa	USP9Y sY117 sY125 sY127 sY134 sY254 sY255
14	46,XY	ضمنAZFa	DBY USP9Y
15	46,XY	ضمنAZFa	DBY

المناقشة

تؤكد الدراسات والبحوث العالمية أن الشذوذات الصبغية تتكرر بشكل أكبر بين الرجال العقيمين من غيرهم من الرجال، وترتفع بشكل خاص نسب هذه الشذوذات الصبغية بين الرجال الذين يعانون من انعدام النطاف في السائل المنوي لتصل إلى 15%[8]. شكلت متلازمة كلاينفيلتير في دراستنا النسبة الكبرى من الشذوذات الصبغية، وتبدو هذه النتائج متوافقة مع الدراسات العالميّة التي تؤكد أنّ الشذوذات الصبغيّة العدديّة ولا سيّما التركيبXXY يشكل النسبة الكبرى من الأسباب المؤدية إلى العقم [10–9]. إلاّ أنّ النسبة التي حصلنا عليها (23.4%) تعدُّ مرتفعة مقارنة بالنسب العالمية، حيث لم تتجاوز 10% في البلاد الأوروبية بحسب دراسة[11] و7.5% عند اليابانيين بحسب دراسة [12]، في حين بلغت نسبة ظهور هذه المتلازمة في عينة من المرضى التونسيين 18% [13]، الأمر الذي يمكن إرجاعه إلى كبر سن الأم وتكرار الحمل والولادة، مما يزيد نسبة حدوث خطأ في الانقسام، باعتبار ارتباط حدوث عدم الافتراق الصبغي (nondisjunction) بعمر الخلايا البيضية الذي يلاحظ بمعدل أعلى كلما ازداد عمر الأم [14]. وقد لاحظنا في دراستنا أن متوسط عمر أمهات حملة هذه المتلازمة بلغ عند الولادة 34 عاماً، وأن ترتيب حامل تلك المتلازمة بين إخوته في معظم الحالات كان الأخير أو قبل الأخير من بين 8–11 أخاً وأختاً تقريباً.

ظهرت لدينا 3 حالات موزائيك بالنسبة إلى متلازمة كلاينفيلتير47,XXY/46,XY بنسبة 1.14%، وبشكل عام فإن هذه الحالات تحدث بسبب عدم افتراق الصبغيات الجنسية في التركيب XXY في مرحلة الانقسام المتساوي (mitoses) خلال المراحل المبكرة من انقسام البيضة الملقحة أو بسبب تلكؤ الصبغي X في الهجرة وفقدانه في سيتوبلازما الخليّة [15] الأمر الذي يؤدي إلى تشكل خطين أو أكثر من الخطوط الخلويّة (cell lines)، وهو ما يعرف بالموزائيكيّة (mosaic).

وجدنا حالة واحدة لمتلازمة ثنائي Y حيث النمط النووي للمريض (47,XYY) ويمكن إرجاع الاختلال في الصيغة الصبغية عند حملة هذه المتلازمة إلى حادثة عدم افتراق الصبغيين YY، حيث ينشأ الصبغي Y، الإضافي كنتيجة لعدم انفصال الصبغيات الأبوية خلال مرحلة الانقسام المنصف الثاني. ويتباين حملة هذه المتلازمة في درجة الخصوبة، فالغالب منهم خصباً (fertile)، وقد سجلت العشرين سنة الماضية آراء متناقضة عن سلوك كلا الصبغيين Y وتوزعهما خلال مرحلة تشكل النطاف، إذ أظهرت بعض الدراسات اضطرابات في عملية تشكل النطاف الناجمة عموماً من الخسارة المبكرة لأحد الصبغيين Y في الخلايا الجنسية XYY [16] الأمر الذي يفسّر خصوبة بعض الرجال الحامليّن لهذه المتلازمة، بينما أظهرت دراسات أخرى [17] وجود أفراد عقيمين

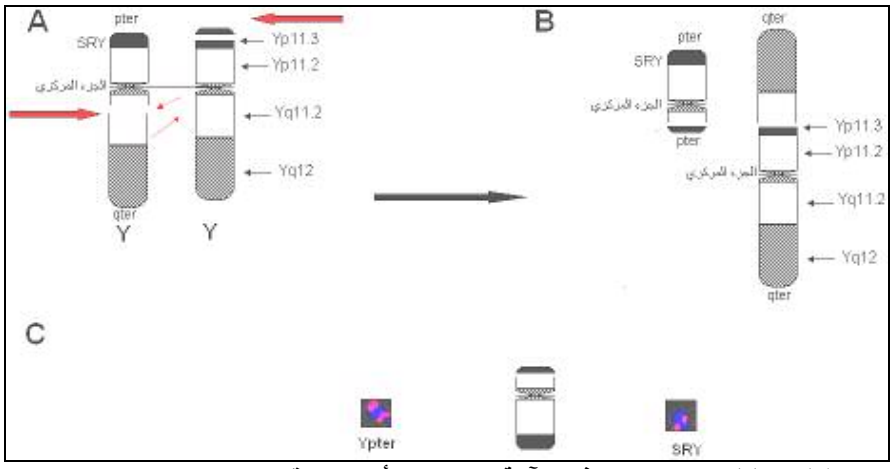
يتميزون بوجود ثنائيات YY في 45% من الخلايا في الطور الاستوائي من الانقسام المنصف الأول، الأمر الذي يشير إلى أن عملية الازدواج الطبيعية (pairing chromosome) بين الصبغيين X و Y قد ثبطت بنتيجة وجود الصبغي Y الزائد، وإنه من الممكن اعتبار هذا الأمر السبب الرئيسي إلى العقم عند تلك الفئة [18]، وهو ما يمكن أن يفسر حالة العقم عند مريضنا.

تعد الشذوذات الصبغية البنيوية أيضاً من الأسباب المؤدية إلى العقم، فهناك أنماط من التبدلات المعروفة التي يرتبط وجودها بحدوث العقم، فالانتقال الصبغي الروبرتسوني (Robertsonian translocation) والانتقال الصبغي المتبادل(Reciprocal translocation) يلاحظان بتكرار أكثر بين الذكور العقيمين منْ غيرهم من الرجال وبنسبة قد تصل إلى 8.5 ضعفاً [19]. وعلى الرغم من أن الانتقالَ الصبغي الروبرتسوني بين الصبغيين 13 و14 يعدُّ من أكثر الانتقالات شيوعاً وتكراراً بين حالات العقم[20]، إلاّ أنّ نتائجنا أظهرت حالة انتقال واحدة بين الصبغيين 14و15 (q10;q10) (14;15) 45,XY,rob ولم يتبيّن لنا من خلال البحث في الدراسات المرجعيّة، وجود حالات موصوفة لانتقال بين هذين الصبغيين مرتبطة بالعقم، غير تلك التي وصفها[21]، حيث أظهرت دراسته حالتين فقط لمثل هذا الانتقال من أصل 14 حالة انتقال روبرتسوني مدروسة ومترافقة مع العقم. وهو ما يمكن مقارنته بنتيجتنا وما يمكن أن يُفسر حالة العقم عند مريضنا الحامل لهذا النمط من الانتقال.

كما أظهرت نتائجنا وجود حالتي انتقال صبغي متبادل(reciprocal translocation) بين الصبغي الجنسي X وأحد الصبغيين الجسميين 9 (p22.2;q31) 46,Y,t (X;9) (وهو موضوع نوقش في ورقة علمية منفصلة).

من الشذوذات الصبغية البنيوية التي وجدناها في دراستنا أيضاً حالة(q12) 46,X,der(Y) وهي من الحالات الجديرة بالاهتمام إذ تبين أنَّ الصبغي Y أصغر من المعتاد وأنَّه قد تعرض لحذف جزء كبير منه، وللتأكد من ذلك قمنا بدراسة هذه الحالة على المستوى الوراثي الخلوي الجزيئي باستخدام تقانة FISH وبتطبيق مسابير خاصة بالصبغي Y، حيث استخدمنا أولاً مسباراً لوسم كامل الصبغي WPC لنفي أي حالة انتقال translocation يمكن أن يكون الصبغي قد تعرض لها وأفقدته جزءاً من بنيته، وقد ظهرت الفلورة على صبغي صغير فقط من صبغيات الطور الاستوائي مما يؤكد أنَّها تعود للصبغي Y وأن فرضية وجود انتقال غير مقبولة. استخدمنا بعدها مسباراً خاصاً لوسم منطقة الجزء المركزي على كلٍ من الصبغي Y والصبغي X (كشاهد) فظهرت إشارة واحدة على كل منهما مما ينفي وجود جزئين مركزيين (حالة dicentric) والتي يمكن أن تحدث فيما لو كان الصبغي Y متساوي الذراعين (إسوياً) ثنائي الجزء المركزي dicentric Y isochromosome ثم استخدمنا مسباراً لوسم المورثة المحددة للجنس

SRY على الذراع القصير في الموقع Yp11.3 حيث ظهرت إشارة واحدة لهذه المورثة دليل على سلامتها. استخدمنا بعدها مسباراً لوسم منطقة الكروماتين المغاير (heterochromatin) على الذراع الطويل في الموقع Yq12 فلم تظهر الإشارة التابعة لهذا المسبار مما يُشير إلى وجود حذف في تلك المنطقة من الصبغي. ثم استخدمنا مسباراً لوسم الأجزاء الانتهائية (telomeres) على الذراع القصير pter والذراع الطويل qter من الصبغي Y ومن الصبغي X (كشاهد) فلم تظهر الإشارة الخاصة بالجزء الانتهائي العائد للذراع الطويلqter من الصبغي Y، بل ظهرت عوضاً عنها الإشارة الخاصة بالجزء الانتهائي العائد للذراع القصير pter مع ظهور الإشارة نفسها في مكانها الطبيعي على الذراع القصير من الصبغي Y.

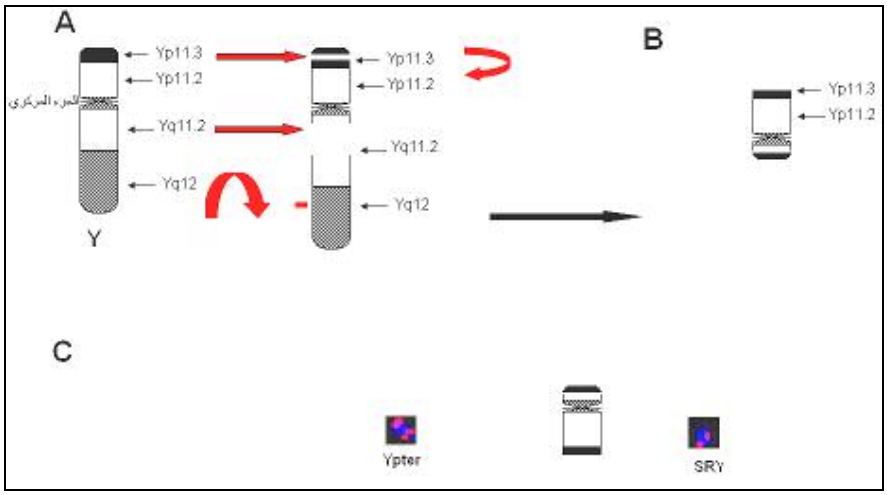


الشكل (1) مخطط ترسيمي نبين فيه الآلية التي يمكن أن يكون قد تشكل بها الصبغي Y عند مريضنا إذ تبين A: الصبغيين الأخوين sister chromatid للصبغي Y وتظهر الأسهم الكبيرة الحمراء مواقع الكسر. أما الأسهم الحمراء الصغيرة فتظهر اتجاه الانتقال. B: فيظهر الصبغيان Y المشتقان بعد عملية التبادل. C: يظهر مخطط الشكل النهائي للصبغي Y عند مريضنا (في الوسط) وإلى اليمين صورة حقيقية بالمجهر توضح نتيجة التهجين بمسبار وسم منطقة SRY وإلى اليسار صورة حقيقية بالمجهر توضح نتيجة التهجين بمسبار وسم الأجزاء الانتهائية على الذراع القصير pter والذراع الطويل qter حيث تبدو إشارتا الوسم pter.

بناءً على تلك المعطيات كلها توصلنا إلى الافتراض أنَّه إمّا أن يكون قد حدث تبادل بين الذراع الطويل من أحد الصبغيين الأخوين (sister chromatid) للصبغي Y والذراع القصير من الكروماتيد الآخر (الشكل1-A) وذلك في مرحلة الطور التالي (metaphase) وبداية طور الهجرة (anaphase) من الانقسام المنصف الثاني في أثناء مرحلة تشكل الأعراس عند والد المريض، الأمر الذي أدى إلى أن يأخذ أحد الصبغيين

الجزء الأكبر من الذراع الطويل للكروماتيد الآخر ويعطيه جزءاً من ذراعه القصير وبذلك تشكل صبغيان Y مشتقان (derivative) أحدهما فاقد لجزء كبير من الذراع الطويل ويحمل الجزء الإنتهائي العائد للذراع القصير pter من الكروماتيد الآخر فضلاً عن الجزء الانتهائي التابع له نفسه في الجهة المقابلة وهو صبغي مريضنا (الشكل B-1). أما الصبغي الآخر فقد يكون له ذراعان طويلان وفاقد للجزء الانتهائي الخاص بالذراع القصير وهذا لايهمنا لأنه لم يدخل في الإلقاح.

أو يمكن أن يكون قد حدث كسران في الصبغي Y نفسه بنتيجة خلل أنزيمي خلال الانقسام المنصف عند الأب (الشكل2) حيث الكسر الأول إلى الأسفل من منطقة الجزء المركزي ضمن Yq11.2، أدى إلى فقدان الجزء المكسور بكامله الذي يشمل معظم الذراع الطويل، والكسر الثاني قرب نهاية الذراع القصير أعلى Yp11.3، مما أدى إلى انقسام الجزء الانتهائي (تيلومير) إلى قسمين والتحام القسم المكسور بالطرف المقابل له من الصبغي من أجل إغلاق نهاية الصبغي Yq، إلا أن التفسير الأول أقوى وأكثر احتمالاً من التفسير الثاني الذي يهمل القطبية الكيميائية للصبغي.



الشكل (2) مخطط نبين فيه الآلية التي يمكن أن يكون بواسطتها قد تشكل الصبغي Y عند مريضنا إذ تبين A : إلى اليسار مخطط ترسيمي للصبغي Y وتظهر الأسهم مواقع الكسر التي يمكن أن تكون قد حدثت. أما B: فتظهر الصبغي Y بعد عملية الكسر والالتحام. ويظهر C: مخطط الشكل النهائي للصبغي Y عند مريضنا، وإلى اليمين صورة حقيقية بالمجهر توضح نتيجة التهجين بمسبار لوسم منطقة SRY، وإلى اليسار صورة حقيقية بالمجهر توضح نتيجة التهجين بمسبار لوسم الأجزاء الانتهائية على الذراع القصير pter و الذراع الطويل qter حيث تبدو إشارتا الوسم pter.

تبين من دراستنا للحذف الدقيق في الموقع AZF من الصبغي Y للمريض نفسه 46,X,der(Y)(q12) وجود حذف كامل للموضعين AZFb وAZFc مع وجود حذف خلالي (interstitial) في الموضع AZFa الأمر الذي يؤكد ما توصلنا له من استنتاج حول كيفيّة تشكل هذا الصبغي، وأيضاً يفسر حالة العقم التي يعاني منها المريض؛ وذلك بسبب فقدان مورثات تشكل النطاف الموجودة في الموقع AZF.

كانت نسبة الشذوذات الصبغية العددية البنيوية منخفضة (0.76 %) تمثلت بظهور حالتين فقط، الأولى 45, X/46, X, der (Y) والمتمثلة بظهور خطين خلويين (موزائيك، mosaic) حيث يحوي الخط الخلوي الأول العدد الكامل من الصبغيات 46, XY.

أما الخط الخلوي الثاني فقد غاب منه الصبغي Y كليّاً فكان عدد صبغياته 45, X، وقد أظهرت الدراسة الصبغيّة للخلايا التي تحوي الصبغي Y أنَّه أصغر من المعتاد، وقد طرأ عليه حذف كبير شمل معظم الذراع الطويل، كما أظهر اختبار الحذف الدقيق في الموقع AZF وجود حذف كامل للموضعين AZFb وAZFc وحذف شمل فقط المورثة *USP9Y* في الموضع AZFa، تأتي هذه النتيجة منسجمة مع الكثير من البحوث والدراسات التي تعدُّ هذا النمط من الشذوذ الصبغي البنيوي شائعاً في حالات العقم ويحدث بنسبة (1.5%) خصوصاً في حالة انعدام النطاف، إذ ترتبط الشذوذات البنيويّة على الصبغيY، والمرئيّة بالدراسة الصبغيّة، ارتباطاً كبيراً مع اختلال الصيغة الصبغيّة الحقيقية aneuploid، بسبب عدم ثبات الصبغي Y الشاذ في أثناء الانقسام المتساوي (mitosis) [22]. ويعدُّ الصبغي Y أكثر عرضة بين الصبغيات لحصول الحذوف الصبغية الداخلية(intrachromosomal deletions) والمؤديّة إلى حالة العقم الذكري [23،24]. وتؤدي التسلسلات التكراريّة (المتكررة) الواقعة على الحدود بين الكروماتين الحقيقي والمتغاير من الذراع الطويل دوراً مهماً في حفظ توازن واستقرار الصبغي Y، ومن ثمّ فإن فقدان هذه المنطقة يفقد الصبغي توازنه مما يؤدي إلى نشوء حالة الموزائيكية [25]. تجدر الإشارة إلى أنَّ أهم ما يُميّز هذا المريض هو قصر القامة، وهذا الأمر متوافق مع العديد من الدراسات التي تشير إلى أن الحذف الكبير الذي يشمل معظم الموقع AZF يترافق في الغالب مع قصر القامة، مما يدل على احتواء هذا الموقع على مورثات مسؤولة عن تحديد طول القامة (stature determination) فضلاً عن المورثات المسؤولة عن تشكل النطاف [26].

أمّا الحالة الثانية من الشذوذات الصبغية العددية البنيوية التي وجدناها فكانت الحالة 47, XXY, add (16) (q24) حيث تميز النمط النووي للمريض فضلاً عن وجود الصبغي الجنسي X الزائد (حالة متلازمة كلاينفيلتير)، بوجود عصابة كبيرة واضحة إضافية على الذراع الطويل من الصبغي 16، بينما بدت جميع صبغياته الأخرى سويّة، الأمر الذي يمكن تفسيره وفق احتمالين: إمّا وجود انتقال متبادل (Reciprocal

translocation) بين أحد الصبغيّات والصبغي 16عند أحد أبويّ هذا المريض مما أدى إلى تشكل الصبغي 16 المشتق الحامل لقطعة من أحد الصبغيات. وباعتبار أن أغلب الانتقالات التي تحدث بين صبغيين غير صنوين، تؤدي إلى تبادل في المواد الوراثيّة بشكل متساوٍ ومتوازن ويكون الحامل لهذا الانتقال صحيحاً ولا تظهر عليه أعراض تذكر، في حين يظهر تأثير هذا الانتقال في أبناءه، فالفرد الذي سيرث هذا الصبغي المشتق غالباً ما تظهر عليّه الأعراض لكونه غير متوازن من الناحيّة الصبغيّة. وهذه هي غالباً حالة مريضنا.

أو يمكن تفسير وجود هذه القطعة من الصبغي بأنَّها جاءت نتيجة حدوث تضاعف (duplication) ناجم عن عمليّة عبور صبغي غير متكافئ (unequal crossing over) خلال مرحلة الانقسام المنصف عند أحد الوالدين.

وبسبب عدم توافر عينات من الأب أو الأم لفحصها لم نستطع التأكد من هاتين الفرضيتين.

تعدُّ حالة الذكر XX من الحالات النادرة والجديرة بالاهتمام من بين الحالات التي تميز بها بحثنا، إذ تبين لنا من خلال الدراسة الوراثية الخلوية والوراثية الجزيئية بأن المريض يحمل التركيب XX في خلاياه وفاقد للصبغي Y ومورثاته بما فيها المورثة *SRY* المسؤولة عن تحديد الجنس. الأمر الذي يشير بوضوح إلى وجود مورثات أخرى تعمل نزلا downstream وتؤدي دوراً حاسماً في تحديد الجنس (وقد شرحت هذه الحالة بالتفصيل في ورقة علمية منفصلة).

بلغت نسبة الحذوف الدقيقة في الموقع AZF من الصبغي Y في دراستنا (12.4%) حيث تميز 15 مريضاً من أصل 121 مريضاً مدروساً بوجود حذف دقيق في الموقع AZF من الصبغي Y، منهم اثنان يبدون شذوذاً صبغياً مرئياً على الصبغي نفسه وقد طال الحذف كامل الموقع AZF وهما الحالة 45, X/46, X, der (Y) والحالة 46, X, der (Y) (q12). أما بقية الحالات فكان النمط النووي فيها سوياً وتميزت 7 حالات منهم بوجود الحذف في الموضع AZFa بنسبة (6%) وحالة واحدة فقط بحذف في الموضع AZFb بنسبة (0.8%) في حين وجدنا 4 حالات حذف في الموضع AZFc بنسبة (3.3%) وحالة واحدة فقط لحذف شمل الموضعين AZFb, AZFc (0.8%)، وبشكل عام تشكل المواضع التي يتألف منها الموقع AZF المنهج التشخيصي الرئيسي لتحليل الحذوف الدقيقة التي يمكن أن تصيب الصبغي Y بسبب احتوائها على المورثات التي تتحكم في السيرورة الصحيحة لتشكل النطاف[5]. وقد أكدت نتائج بحوث [27-28] بأنَّ الحذف على أيٍّ أو على كل من تلك المواضع الثلاثة، تعطل عملية تشكل النطاف، ولم يثبت حتى الآن بأن الخلل الذي يمكن أن يصيب تلك المواضع له تأثير آخر في الفرد غير حدوث العقم.

تعدُّ المورثــة *USP9Y* (ubiquitin-specific protease 9, Y chromosome)، أولى المورثات التي تم تعرّفها في الموضع AZFa والتي تتميز بدورها فــي الخــصوبة وعملية تشكل النطاف [29]. إلا أنّ الدراسات المقارنة أظهرت وجود مورثات أخرى في الموضع AZFa تؤدي دوراً بارزاً في عملية تشكل النطاف مثل المورثة *DBY* (Dead box on Y) [30] وهي عرضة للحذف أكثر من المورثة *USP9Y*، وتتميز عنها بــأن تعبيرها محصور فقط ضمن الخصى [31] تأتي هذه النتائج متوافقة مع ما وجــدناه فــي دراستنا، فقد وجدنا 4 حالات حذف طالت المورثة *DBY* فقط، في حين وجدنا 3 حالات شملت المورثتين معاً USP9Y وDBY. ومما يثير الاهتمام فــي نتائجنــا، أنّ النــسبة الكبرى من الحذوف الدقيقة التي وجدناها، كانت في الموضع AZFa. في حــين تؤكــد معظم البحوث العالمية أن نسب الحذف في الموضع AZFa تلاحظ بتكرار أقل، مقارنــة بنسب الحذوف في بقية المواضع AZF [5]، [32] وأنّ الحذف في الموضع AZFc يعدُّ المسبب الأكثر شيوعاً لظهور حالة فشل تشكل النطاف، بنسب تــصل إلــى 80 % مــن الحالات [33]. الأمر الذي يشير إلى الخصوصية التي يتمتع بها المجتمع الــسوري وأن نسب تكرار الطفرات فيه تختلف عن غيره من المجتمعات الأخــرى ويؤكــد ضــرورة الدراسة المعمقة لمثل هذه الطفرات لتحديد نسبها بدقة والكشف عن أسبابها ومسبباتها.

REFERENCES المراجع

(1) WHO. (1987). Towards more objectivity in diagnosis and management of male infertility. *Int. J Androl.* 7: (Suppl)1- 53.

(2) Hargreave TB. (2000). Genetic basis of male fertility. *Br. Med. Bull* .56:650-671.

(3) Huynh T, Mollard R, Trounson A. (2002). Selected genetic factors associated with male infertility. *Hum. Reprod. Update.* 8: 183-198.

(4) Mau-Holzmann UA. (2005). Somatic chromosomal abnormalities in infertile men and women. *Cytogenet. Genome. Res*. 111(3-4):317-36

(5) Vogt PH, Edelmann A, Kirsch S, Henegariu O, Hirschmann P, Kiesewetter F,Kohn FM, Schill WB, Farah S, Ramos C, Hartmann M, Hartschuh W, Meschede D,Behre HM,Castel A, Nieschlag E,Weidner W,Grone HJ,Jung A, Engel W,Haidl G. (1996). Human Y chromosome azospermia factors (AZF) mapped to different subregions in Yq11. *Hum. Mol. Genet*. 5:933-943.

(6) Mc Graw-Hill. (1995). Human chromosomes; Principles and techniques.

(7) ISCN. (2005). AN International System For Human Cytogenetic Nomenclature. Shaffer L. G., Tommerup N. (eds); *S.Karger*, Basel

(8) Ferlin Alberto, Barbara Arredi, Carlo Foresta.Genetic. (2006). causes of male infertility. *Reproductive Toxicology*. 22:133–141

(9) Bhasin S, Mallidis C, Ma KL. (2000). The genetic basis of infertility in men. Baillieres Best Pract. Res. *Clin. Endocrinol. Metab*. 14:363-388.

(10) Vogt PH. (2003). Molecular Genetic of Human Male Infertility: From Genes to New Therapeutic Perspectives. *Bentham Science Publishers Ltd*.

(11) De Braekeleer M, Dao TN. (1991). Cytogenetic studies in male infertility: a review. *Hum. Reprod*. 6:245–250

(12) Okada H, Fujioka H, Tatsumi N, Kanzaki M, Okuda Y, Fujisawa M. (1999). Klinefelter's syndrome in the male infertility. *clinic. Hum. Reprod*. 14:946–952

(13) Abdelmoula NB, Amouri A, Portnoi MF, Saad A, Boudawara T, Mhiri MN, Bahloul A, Rebai T. (2004). Cytogenetics and fluorescence in situ hybridization assessment of sex-chromosome mosaicism in Klinefelter's syndrome. *Ann. Genet*. 47(2):163-75.

(14) Mueller Robert F. Young, Ian D. (2001). EMERY'S ELEMENTS OF MEDICAL GENETICS 11^{ed} Churchill Livingstone. 29-31\44-45

(15) Mange E, Mange A. (1994). Basic Human Genetics. *Sinauer. Associates Inc*. 223-225

(16) Speed, R.M., Faed, M.J.W., Batstone, PJ. et al. (1991). Persistence of two Y chromosomes through meiotic prophase and metaphase I in an XYY man. *Hum. Genet.* 87, 416-420

(17) Hulten, M. and Pearson, PL. (1971). Fluorescent evidence for spermatocytes with two Y chromosomes in an XYY male. *Ann. Hum. Genet.* 34, 273-277.

(18) Berthelsen JG, Skakkebaek NE, Perboll O, et al. (1981). Electron microscopic demonstration of the extra Y chromosome in spermatocytes from human XYY males In Development and function of reproductive organs. *Excerpta. Medica. Amsterdam*. 328-337

(19) Antonelli, A., Gandini, L., Petrinelli, P., Marcucci, L., Elli, R., Lombardo, F. (2000). Chromosomal alterations and male infertility. *J Endocrinol. Invest*. 23: 677.

(20) Guichaoua MR, Quack B, Speed RM, Noel B, Chandley AC, Luciani JM. (1990). Infertility in human males with autosomal translocations: meiotic study of a 14;22 Robertsonian translocation. *Hum. Genet.* 86:162-166

(21) Ogur Gonul, Elvire Van Assche, Walter Vegetti, Greta Verheyen, Herman Tournaye, Maryse Bonduelle, André Van Steirteghem and Inge Liebaers. (2006). Chromosomal segregation in spermatozoa of 14 Robertsonian translocation carriers. *Molecular Human Reproduction*. 12(3):209-215

(22) Hsu LYF. (1994). Phenotype/karyotype correlations of Y chromosome aneuploidy with emphasis on structural aberrations in postnatally diagnosed cases. *Am. J. Med. Genet. 53:108–40*

(23) Siffroi JP, Le Bourhis C, Krausz C,Barbaux S, Quintana- Murci L, Kanafani S, Rouba H, Bujan L, Bourrouillou G, Seifer I,Boucher D, Fellous M, McElreavey K,Dadoune JP (2000). Sex chromosome mosaicism in males carrying Y chromosome long arm deletions. *Hum. Reprod.* 15:2559-2562.

(24) Siffroi JP, Le Bourhis C, Krausz C,Barbaux S, Quintana- Murci L, Kanafani S, Rouba H, Bujan L, Kleiman SE, Bar-Shira Maymon B, Yogev L, Paz G, Yavetz H. (2001). The prognostic role of the extent of Y microdeletion on spermatogenesis and maturity of Sertoli cells. *Hum. Reprod.* 16: 399-402.

(25) Jakubowski L, Jeziorowska A, Constantinou M, Kaluzewski B. (2000). Molecular analysis of Y chromosome long arm structural instability in patients with gonadal dysfunction. *Clin. Genet*. 57:291–5

(26) Kleiman SE, Bar-Shira Maymon B, Yogev L, Paz G, Yavetz H. (2001). The prognostic role of the extent of Y microdeletion on spermatogenesis and maturity of Sertoli cells. *Hum. Reprod*. 16: 399-402

(27) Sun C,Skaletsky H, Birren B, Devon K, Tang Z, Silber S, Oates R, Page DC. (1999). An azoospermic man with a de novo point mutation in the Y chromosomal gene USP9Y. *Nat. Genet.* 23:429-432.

(28) Sun C,Skaletsky H, Rozen S, Gromoll J,Nieschlag E, Oates R, Page DC. (2000). Deletion of azospermia factor a (AZFa) region of human Y chromosome caused by recombination between HERV15 proviruses. *Hum. Mol. Genet*. 9:2291-2296

(29) Huynh T, Mollard R, Trounson A. (2002). Selected genetic factors associated with male infertility. *Hum. Reprod. Update*. 8:183-198.

(30) Lahn, B. T. & Page, D. C. (1997) Functional Coherence of the Human Y Chromosome. *Science*. 278: 675– 680.

(31) Foresta C, Moro E, Rossi A, Rossato M, Garolla A, Ferlin A. (2000). Role of the AZFa candidate genes in male infertility. *J. Endocrinol. Invest*. 23: 646-651

(32) Brown GM, Furlong RA, Sargent CA, Erickson RP, Longepied G, Mitchell M, Jones MH, Hargreave TB, Cooke HJ, Affara NA. (1998). Characterisation of the coding sequence and fine mapping of the human DFFRY gene and comparative expression analysis and mapping to the Sxrb interval of the mouse Y chromosome of the Dffry gene. *Hum. Mol. Genet.* 7: 97-107.

(33) McElreavey K, Krausz C, Bishop CE. (2000). The human Y chromosome and male infertility. *Results. Probl. Cell. Differ*. 28:211-232.