

# Chromosoomstudies in die ginekologie

A. E. RETIEF

## Summary

Clinical indications for chromosome analysis in patients with gynaecological problems are well defined. These include, with primary or secondary amenorrhoea, infertility and repeated miscarriages in adults or retarded puberty and abnormal sexual development in young girls. The type of chromosome abnormality, the incidence, and the management of patients are discussed with reference to 15 years' experience in the Department of Cytogenetics at Tygerberg Hospital. The cytogenetics of 419 patients with amenorrhoea are discussed under headings such as gonadal dysgenesis, monosomy X, chromosome mosaics and the XY female phenotype. Results of chromosome studies in 540 males with a low sperm count are given. The importance of chromosome studies in repeated miscarriages and genetic counselling for carriers of balanced translocations is stressed.

*S Afr Med J* 1985; **68**: 648-651.

Die eerste geslachtschromosoomafwyking van 45,X is in 1959 beskryf by 'n vroulike pasiënt met gonadale disgenese en Turner-sindroomfenotipe.<sup>1</sup> Sedertdien word chromosoomondersoeke gedoen op volwasse pasiënte met ginekologiese probleme soos amenorree en infertiliteit (ook herhaalde miskrame) en by dogters met vertraagde puberteit en abnormale geslagtelike ontwikkeling. Verskeie studies is die afgelope jare gerapporteer van die voorkoms van chromosoomafwykings in groepe pasiënte met hierdie probleme. Ons kennis m.b.t. verwagte chromosoomafwykings binne 'n bepaalde groep pasiënte, hantering van en genetiese voorligting aan pasiënte en families het nou 'n peil bereik waar pasiënte met vertroue behandel kan word. Die verwagting is dat daar nie nuwe kennis op hierdie gebied na vore sal kom nie, maar met die snelle ontwikkeling op die gebied van navorsing van die DNS-molekule betree die vakgebied 'n baie opwindende era.

In hierdie skrywe word ons kennis van die voorkoms van chromosoomafwykings, die tipe en die hantering van pasiënte in die ginekologie bespreek aan die hand van 15 jaar ondervinding in die Departement Sitogenetika, Tygerberg-hospitaal.

## Kariotipe-fenotipekorrelasies

### Gonadale disgenese

Gonadale disgenese word gewoonlik waargeneem in pasiënte met monosomie vir die X-chromosoom (45,X) of in pasiënte met strukturele abnormaliteite van die X-chromosoom. Pasiënte

met normale chromosome (46,XX) en gonadale disgenese word egter dikwels waargeneem. In hierdie groep mag daar gevalle wees waar 'n klein deleisie van die X-chromosoom verantwoordelik kan wees vir die gonadale disgenese. Selfs met die maksimumresolusie van die ligmikroskoop kan klein deleisies nie opgespoor word nie. 'n Ander moontlike oorsaak vir gonadale disgenese in pasiënte met normale chromosome mag 'n enkelgeendefek wees. Ander metodes, miskien op die DNS-vlak, sal gevind moet word vir die diagnose van hierdie gevalle.

### Monosomie X

Sekere somatiese afwykings wat in gevalle van 45,X voorkom, stem ooreen met dié wat deur Turner beskryf is. Omtrent alle 45,X-individue het 'n kort postuur en sekere van die kenmerke van Turner-sindroom. In gevalle waar voorligting gegee word aan dogters met dié afwyking, moet gemeld word dat amenorree en steriliteit verwag kan word.

### X-chromosoommosaïeke en strukturele veranderinge

Die fenotipiese voorkoms van individue met X-chromosoommosaïeke of delesiesamestelling kan varieer van dié met streepgonades, kort postuur en Turner-kenmerke tot normaal. By mosaïeke is die persentasie normale selle van belang — dié met 'n hoë persentasie normale selle sal na verwagting 'n meer normale voorkoms hê. By delesies is die gedeelte van die een X-chromosoom wat afwesig is van belang, hoe groter die gedeelte hoe hoër is die verwagting van 'n tipiese Turner-fenotipe. Daar is ook aanduidings dat sekere gedeeltes van die X-chromosoom meer belangrik is as ander. In die algemeen blyk dit dat delesies van die kort arm van die X-chromosoom (del Xp en isochromosome van die lang arm iXq), met kort postuur en Turner-kenmerke gepaard gaan. Dit wil verder voorkom asof gene op die lang arms van die X-chromosoom belangrik is in ovariale ontwikkeling. Getuienis hiervoor word gevind in pasiënte met Xq-outosoomtranslokasies wat presenteer met primêre of sekondêre amenorree.

### Amenorree

Pasiënte met primêre of sekondêre amenorree moet vir 'n chromosoomondersoek verwys word. In gevalle van sekondêre amenorree van 6 maande of langer is dit vanselfsprekend dat die klinikus pasiënte by wie geen ander kliniese oorsake vir die amenorree gevind kon word nie sal verwys.

In die tydperk 1969 tot 1983 is 419 vroulike pasiënte met klages van amenorree vir chromosoomondersoeke na die Departement Sitogenetika, Tygerberg-hospitaal verwys. Die chromosoomresultate is volgens die indikasie van verwysing in drie groepe geklassifiseer, nl: (i) 186 pasiënte ouer as 18 jaar met primêre amenorree; (ii) 180 pasiënte met sekondêre amenorree van 'n 6 maande-tydperk of langer; en (iii) 53 pasiënte met oligomenorree (Tabel I). Chromosoomondersoeke het getoon dat 33% van die 186 pasiënte met primêre amenorree, 3% van die 180 pasiënte met sekondêre amenorree en 2% van die oligomenorree-groep abnormale chromosome het. Hierdie syfers bevestig dus die belang van chromosoomondersoeke in hierdie groep pasiënte.



**TABEL I. CHROMOSOOMSTUDIES IN PASIËNTE MET AMENORREE**

	Aantal verwys	Aantal abnormaal	%
Primêre amenorree	186	56	33
Sekondêre amenorree	180	6	3
Oligomenorree	53	1	2
<b>Totaal</b>	<b>419</b>	<b>63</b>	

**Chromosoomafwykings in primêre amenorree**

Die tipes chromosoomafwykings wat by pasiënte met primêre amenorree gevind is, word in Tabel II aangegee. Soos verwag kan word, is 'n hoë persentasie (23%) van die afwykings dié van 45,X geassosieer met Turner-fenotipe. In 'n verdere 41% van die afwykings is die chromosoomafwykings dié van 'n mosaïekbeeld met die 45,X-sellyn in die meeste gevalle teenwoordig. In 7% van die afwykings is 'n strukturele afwyking van een van die X-chromosome waargeneem. In 'n hoë persentasie (29%) van gevalle met afwykings is 'n chromosoomsamestelling van 46,XY (normaal manlik) gevind. Hierdie chromosoombeeld in gevalle van primêre amenorree dui op X-chromosoom-gekoppelde resessiewe oorerwing en is geassosieer met die testikulêre feminiserende sindroom of met gonadale disgenese.

**TABEL II. CHROMOSOOMAFWYKINGS IN PRIMÊRE AMENORREE**

Tipe Afwyking	Aantal	% van totale afwykings
<b>Numeriese afwykings</b>		
45,X	13	23%
<b>Mosaïeke</b>		
45,X/46,X,i(Xq)	8	
45,X/46,X,r(X)	5	
45,X/46,XY	4	
45,X/46,XX	3	
45,X/46,X,del(X)(pter-q25:)	1	
45,X/46,X,t(Xq+)(q28?)	1	
46,XX/47,XXX/48,XXXX	1	
<b>Totaal</b>	<b>23</b>	<b>41%</b>
<b>Strukturele afwykings</b>		
46,X,i(Xq)	2	
46,X,del(X)(pter-q24:)	1	
46,X,t(X,7)(q24,qter)	1	
<b>Total</b>	<b>4</b>	<b>7%</b>
<b>Enkelgeenafwyking (geslagsgekoppel)</b>		
46,XY	16	29%
<b>Groototaal</b>	<b>56</b>	

**Chromosoomafwykings in sekondêre amenorree en oligomenorree**

In Tabel III word die chromosoomafwykings wat met sekondêre amenorree en oligomenorree aangetref word, aangedui. In alle gevalle is 'n X-chromosoom betrokke, hetsy in 'n mosaïekpatroon of in 'n strukturele herrangskikking. Interessant is dat breekpunte van die X-chromosome by die 3 gevalle van X-ootosoomtranslokasies betrokke is. Al drie breekpunte val in 'n area q22 tot q26 van die lang arm van die een X-chromosoom.

**TABEL III. CHROMOSOOMAFWYKINGS IN SEKONDÊRE AMENORREE EN OLIGOMENORREE**

<b>Sekondêre amenorree</b>	
<b>Mosaïeke</b>	
45,X/46,XX/46,X,del(X)(pter-q24:)	1
45,X/46,XX/46,X,r(X)	1
<b>Strukturele afwykings</b>	
46,X,i(Xq)	1
46,X,t(X;17)(q26;q25)	1
46,X,t(X;3)(q24;qter)	1
46,X,t(X;2;15)(q22;p11)	1
<b>Oligomenorree</b>	
46,X,del(X)(pter-q22:)	1

Aangesien die translokasies in al 3 gevalle gebalanseerd voorkom, word die afleiding gemaak dat belangrike gene in terme van ovariale ontwikkeling in hierdie gebied van die X-chromosoom geleë is. In herrangskikking van gene deur 'n translokasie is die normale fisiologie of genewerking versteur sodat die pasiënt met sekondêre amenorree presenter. Dieselfde verklaring kan gegee word vir die kliniese afwykings wat gevind word in die pasiënte met delesies waar breekpunte by q24 in primêre amenorree en by q22 in oligomenorree waargeneem is.

**46,XY-testikulêre feminiserende sindroom**

Dié pasiënte is fenotopies vroulik met goeie borsontwikkeling en presenter almal met primêre amenorree. Bilaterale testes is normaal in grootte en word gevind in posisies vanaf die buikholte tot in die labia majora. Die voorkoms van tumore is verhoog en daar word aanbeveel dat 'n gonadektomie voor die ouderdom van 25 jaar gedoen word. Weens 'n mutasie van 'n X-gekoppelde geen wat waarskynlik vir androgeenreseptore kodeer, word hierdie toestand toegeskryf aan 'n endorgaanonsensitiwiteit vir androgene.

**XY-gonadale disgenese**

Vroulike individue met normaal manlike 46,XY-chromosome presenter dikwels met primêre amenorree, gonadale disgenese en Turner-stigmata. Hul lengte is dikwels normaal, maar borste en eksterne geslagsorgane is swak ontwikkel. Omtrent 20-30% van pasiënte met XY-gonadale disgenese het 'n disgerminoom of gonadoblastoom. Weens hierdie hoë voorkoms word gonades gewoonlik net na die diagnose gemaak is chirurgies verwyder. 'n Moontlike teorie vir hierdie toestand is 'n mutasie van 'n X-gekoppelde geen wat verantwoordelik is vir HY-antigeenproduksie of -binding, wat veroorsaak dat gonadale differensiasie nie plaasvind nie.

**Familiestudies in XY- vroulike fenotipes**

Die X-gekoppelde resessiewe oorerwing in gevalle van 46,XY-chromosome en vroulike fenotipes dui op verdere familie-ondersoeke. Dikwels word dieselfde afwyking in susters, niggies en tantes aan moederskant gevind. Draers (heterosigote) vir hierdie toestand is fenotopies normaal, maar het 'n 50%-kans vir 'n herhaling in die 46,XY-nageslag. Ongelukkig kan draers nie in hierdie stadium van normaal onderskei word nie; die afleiding word gewoonlik uit 'n stamboomanalise gemaak.

**Ware hermafrodiete**

Individue met 'n fenotopiese voorkoms van interseks by wie aangetoon word dat hulle ovariale sowel as testisweefsels in die



gonades het, word as ware hermafrodiete geklassifiseer. In die meeste gevalle is 'n 46,XX-chromosoomsamestelling by hierdie individue gevind. Die mees aanvaarbare hipotese vir die voorkoms van testikulêre weefsel by hierdie individue met 'n oënskynlike normale vroulike chromosoomsamestelling is dié van 'n X-Y-translokasie.<sup>2</sup> Omdat die meeste ware hermafrodiete sporadies voorkom, word gepostuleer dat gedeeltes van die Y-chromosoom gedurende meiose I in die vader translokeer op die kort arms van die X-chromosoom. Hierdie getranslokeerde gedeelte is in die meeste gevalle so klein dat dit nie mikroskopies in die kariotipe waargeneem kan word nie.

### Chromosoomondersoeke by infertiliteit

In gevalle waar ouerpare probleme ondervind met infertiliteit kan 'n chromosoomondersoek in die geval van die manlike eggenoot oorweeg word na 'n deeglike spermogram gedoen is. Indien die spermogram herhaaldelik 'n lae spermertelling aantoon, dui dit op 'n chromosoomanalise. Ons het onlangs die voorkoms van chromosoomafwykings by mans met 'n spermertelling van minder as 10 miljoen per milliliter gerapporteer.<sup>3</sup> In dié ondersoek het ons aangetoon dat die voorkoms van chromosoomafwykings by mans met asoöspermie 14,1% is en by dié met 'n lae saadtelling 5,1%.

In Tabel IV word addisionele gegewens weergegee van die voorkoms van chromosoomafwykings by mans wat gedurende die tydperk 1969 tot 1983 na die Departement Sitogenetika, Tygerberg-hospitaal vir 'n chromosoomondersoek verwys is. In die groep van 119 mans met asoöspermie is 18 (15%) met 'n chromosoomafwyking gevind en in die groep van 421 mans met 'n spermertelling van minder as  $10^6$ /ml, is 20 (5%) met afwykings gevind.

**TABEL IV. CHROMOSOOMSTUDIES VAN INFERTIELE MANS**

	Aantal ondersoek	Aantal abnormaal	%
Asoöspermie	119	18	15,1
Oligosoöspermie	421	20	5,0
Totaal	540	38	7,0

In Tabel V word die chromosoomafwykings wat in die groepe gevind is uiteengesit. In die asoöspermiegroep is alleenlik X- and Y-chromosoomafwykings waargeneem. Die meerderheid van gevalle is die 47,XXY- of Klinefelter-sindroom met die mees kenmerkende fenotipiese afwykings van klein testes, soms ginekomasie en verlaagde testosteroonvlakke.

In die groep afwykings wat by oligosoöspermie gevind is, is geslagschromosome in die helfte van die gevalle betrokke en by die ander hoofsaaklik outosomale strukturele afwykings in die vorm van gebalanseerde translokasies.

### Chromosoomondersoeke by herhaalde miskrame

Indien 'n vrou drie of meer miskrame gehad het, kan 'n chromosoomondersoek by beide ouers as 'n moontlike oplossing van die probleem oorweeg word. Die voorkoms van chromosoomafwykings in die groep is egter laag, in die omgewing van 3%. Nogtans is dit miskien die moeite werd om die ondersoek te laat doen, eendersyds om 'n gebalanseerde translokasie by een van die ouers uit te skakel as die oorsaak van die herhaalde miskrame, maar andersyds om meer te wete te kom van die probleem van herhaalde miskrame. Dikwels is dit die moeite werd om fetale weefsel vir 'n chromosoomanalise te probeer

**TABEL V. CHROMOSOOMAFWYKINGS IN ASOÖ- EN OLIGOSOÖSPERMIE**

<b>Asoöspermie</b>		
47,XXY		9
46,XY/47,XXY		4
46,XY/47,XYY		1
47,XXY/48,XXXXY/49,XXXXY		1
46,XX		2
45,X/46,XY		1
<b>Totaal</b>		<b>18</b>
<b>Oligospermie</b>		
<b>Geslagschromosome</b>		
47,XXY		4
46,XY/47,XXY		3
47,XYY		2
46,XY/47,XYY		1
<b>Totaal</b>		<b>10</b>
<b>Outosomaal</b>		
46,XY/47,XY,+mar		2
45,X,t(Y;21)(q11;p11)		1
46,XY,t(1;4)(q12;qter)		1
46,XY,t(7;15)(qter;q15)		1
45,XY,t(15;21)(p11;q11)		1
45,XY,t(13;14)(p11;q11)		2
45,XY,t(14;21)(p11;q11)		1
46,XY,inv(3)(pter;q13)		1
<b>Totaal</b>		<b>10</b>

bekom. Soos reeds genoem, is die tipe afwykings wat gevind word by ouers hoofsaaklik gebalanseerde outosomale translokasies.

### Voorligting aan draers van 'n gebalanseerde translokasie

Indien 'n persoon 'n draer van 'n gebalanseerde translokasie is, is die teoretiese kans vir 'n afwyking in die nageslag 50%. In die praktyk word dit selde gevind om verskeie waarskynlike redes: Eerstens, veral in die geval waar die man dit dra, en afhangende van die grootte van die betrokke chromosoomgedeeltes, word gedurende spermatogenese 'n seleksie teen abnormale sperme gevind. Dit word waargeneem by mans met probleme van infertiliteit (sien die aantal gebalanseerde translokasies in Tabel V), en ook as 'n lae persentasie-voorkoms van abnormale chromosoomafwykings in sy nageslag. In die geval waar die vrou 'n draer is, is die persentasie afwykings wat in die nageslag gevind word hoër, maar selde hoër as 10%. Hierdie syfers word dan ook dikwels gebruik in genetiese raadgeewing aan draers van gebalanseerde translokasies.

Indien 'n draer van 'n gebalanseerde translokasie opgespoor word, is dit raadsaam om aan te beveel dat daar met elke swangerskap op 16-17 weke 'n amniosentese oorweeg word. Met die inligting van die chromosoomherrangskikking van die betrokke ouer byderhand, sal 'n chromosoomondersoek van die gekweekte amniotiese selle met 'n 100% sukses kan uitwys of die fetus se chromosome normaal sal wees of nie. 'n Terapeutiese miskraam word dus aanbeveel in gevalle waar ongebalanseerde chromosoomsamestelling in fetale selle waargeneem word.

Die ondersteuning van die Kaaplandse Provinsiale Administrasie, die Universiteit van Stellenbosch en die Suid-Afrikaanse Mediese Navorsingsraad word met dank erken.



## VERWYSINGS

1. Ford CE, Jones KW, Polani PE *et al.* A sex-chromosome anomaly in a case of gonadal dysgenesis (Turner syndrome). *Lancet* 1959; **i**: 711-713.
2. Van Niekerk WA, Retief AE. Nuwe kennis met betrekking tot die etiologie

- en patogense van ware hermafrodiete. *S Afr Med J* 1981; **60**: 195-198.
3. Retief AE, Van Zyl JA, Menkveld R *et al.* Chromosome studies in 496 infertile males with a sperm count below 10 million/ml. *Hum Genet* 1984; **66**: 162-166.

# Osmolarity studies with different containers and volumes in a human *in vitro* fertilization programme

T. F. KRUGER, F. S. H. STANDER, R. MENKVELD, C. J. LOMBARD

## Summary

In performing *in vitro* fertilization, a stable osmolarity in the medium surrounding the egg or embryo is of the utmost importance if a good fertilization and pregnancy rate is to be achieved. This study evaluated osmolarity changes in different volumes of fluid in the Falcon 3001 and 3037 Petri dishes and the Falcon 2058 tissue culture tube over a 24-hour period. It was found that the osmolarity was more stable in the Falcon 3037 Petri dish and in the tissue culture tube. The 3037 Petri dish was chosen for culturing human embryos.

*S Afr Med J* 1985; **68**: 651-652.

Simulating physiological conditions in human *in vitro* fertilization work is of the utmost importance to achieve a good fertilization and pregnancy rate.<sup>1</sup> These factors are a pH of 7,4 in the growth medium, a stable temperature of 37°C, a high humidity of 98% and a constant osmolarity in the medium being used.

The osmolarity of the medium in different Petri dishes and in a tissue culture tube over a 24-hour period was evaluated.

**Infertility Clinic, Department of Obstetrics and Gynaecology, University of Stellenbosch and Tygerberg Hospital, Parowvallei, CP**

T. F. KRUGER, M.PHARM.MED., M.MED. (O. ET G.), F.C.O.G. (S.A.), M.R.C.O.G.

F. S. H. STANDER, *Cytotechnician*

R. MENKVELD, B.SC. (AGRIC.), B.SC.HONS, M.SC.

**Institute for Biostatistics of the South African Medical Research Council, Parowvallei, CP**

C. J. LOMBARD, PH.D.

## Method

Two tissue culture Petri dishes were chosen, the Falcon 3001 and the 3037, and a tissue culture tube, the Falcon 2058.

The osmolarity of the medium was always 282 mosm/kg after preparation. The same medium was used in all experiments. Different volumes of medium were used in the 3001 Petri dishes — 2, 4 and 5,5 ml; the 3037 dishes always contained 6 ml — 1 ml in the central well and 5 ml surrounding the well; and the 5 ml culture tube contained 1 ml. The containers were filled simultaneously with the different volumes and put into the incubator for 24 hours (Forma Scientific No. 3163).

Twenty-four hours later readings were taken with a 5100 C Vapor Pressure Osmometer, previously calibrated. A drop of medium was obtained from each holder in the incubator and the readings noted carefully.

This experiment was performed 9 times under similar conditions.

## Results

The osmometer readings are shown in Table I. The original osmolarity at 0 hours was always 282 mosm/kg. After 24 hours the mean reading ( $\pm$  SD) in the Falcon 3001 with 2 ml fluid (group I) was  $307 \pm 4,11$  mosm/kg, in the 4 ml volume dish (group II) it was  $297 \pm 3,71$  mosm/kg and in the 5,5 ml (group III) it was  $289 \pm 2,42$  mosm/kg. Mean readings in the Falcon 3037 (group IV) containing 6 ml of medium was  $283 \pm 2,08$  mosm/kg and in the Falcon 2058 tube (group V) with 1 ml it was  $284 \pm 1,66$  mosm/kg. The multiple-comparison procedure of Schaffe was used to compare the mean osmolarity levels after 24 hours at a significance level of  $P = 0,05$ .

Osmolarity levels in groups I, II and III differed from each other and from those in groups IV and V. Groups IV and V did not differ from each other in osmolarity levels but levels were significantly greater than the base value of 282 mosm/kg (*t*-test,  $P < 0,05$ ).

The stability of the osmolarity in the five containers varied from group I as the least stable to group V as the most stable. This can be seen by looking at the coefficient of variance in Table I.