

Сперматологическая характеристика мозаичной и немозаичной формы синдрома Клайнфельтера

М. И. Штаут¹, Т. М. Сорокина¹, Л. Ф. Курило¹, В. Б. Черных^{1,2}

¹ФГБНУ «Медико-генетический научный центр им. Н. П. Бочкова»; Россия, 115522 Москва, ул. Москворечье, 1;
²ФГБОУ ВО «Российский национальный исследовательский медицинский университет им. Н. И. Пирогова» Минздрава России;
Россия, 117437 Москва, ул. Островитянова, 1

Контакты: Вячеслав Борисович Черных chernykh@med-gen.ru

Цель исследования – оценить влияние цитогенетического варианта синдрома Клайнфельтера (СК) на параметры эякулята у пациентов с СК.

Материалы и методы. Обследованы 85 пациентов с СК: 1-ю группу составили 75 пациентов в возрасте 17–39 лет с немозаичной формой СК (кариотипом 47,XXY), 2-ю группу – 10 мужчин в возрасте 22–57 лет, у которых выявлены мозаичные формы СК: 47,XXY/46,XY ($n = 9$), 48,XXY,der(X)/47,XXY/46,XY ($n = 1$).

Результаты. Объем эякулята составил $1,9 \pm 1,3$ (0,1–5,5) мл у пациентов с кариотипом 47,XXY и $1,5 \pm 1,2$ (0,05–4,00) мл у пациентов с мозаичной формой СК, pH семенной жидкости – соответственно $7,8 \pm 0,5$ (6,5–9,0) и $7,8 \pm 0,2$ (7,5–8,1), концентрация сперматозоидов – $0,27 \pm 1,42$ (0,00–12,50) и $0,12 \pm 0,28$ (0,00–0,90) млн/мл. Вязкость спермы повышена относительно нормативных значений в 41 и 22 % образцов соответственно. При количественном кариологическом анализе половые клетки обнаружены в 42 % образцов осадка эякулята пациентов с регулярной формой СК и в 20 % образцов осадка эякулята пациентов с мозаичной формой СК, что указывает на частичное сохранение сперматогенеза.

Заключение. Выраженность нарушений сперматогенеза у пациентов с СК варьировала в широких пределах, параметры эякулята и число половых клеток в осадке эякулята статистически значимо не различались. Наличие немногочисленных сперматозоидов (криптозооспермия) и незрелых половых клеток в осадке эякулята указывает на частичное сохранение сперматогенеза.

Ключевые слова: синдром Клайнфельтера, мужское бесплодие, азооспермия, сперматогенез, сперматозоиды, незрелые половые клетки, эякулят

Для цитирования: Штаут М.И., Сорокина Т.М., Курило Л.Ф., Черных В.Б. Сперматологическая характеристика мозаичной и немозаичной формы синдрома Клайнфельтера. Андрология и генитальная хирургия 2019;20(4):12–6.

DOI: 10.17650/2070-9781-2019-20-4-12-16

Spermatological characteristics of mosaic and non-mosaic forms of Klinefelter syndrome

M.I. Shtaut¹, T.M. Sorokina¹, L.F. Kurilo¹, V.B. Chernykh^{1,2}

¹N.P. Bochkov Research Centre for Medical Genetics; 1 Moskvorechye St., Moscow 115522, Russia;

²N.I. Pirogov Russian National Research Medical University, Ministry of Health of Russia; 1 Ostrovityanova St., Moscow 117437, Russia

The study objective is to compare of ejaculate parameters in mosaic, non-mosaic Klinefelter syndrome (KS).

Materials and methods. Eighty-five patients with KS were examined. The group 1 included 75 patients between the ages of 17 and 39 with non-mosaic KS (47,XXY), the group 2 included 10 males between the ages of 22 and 57 years with mosaic KS: 47,XXY/46,XY ($n = 9$), 48,XXY,der(X)/47,XXY/46,XY ($n = 1$).

Results. KS patients semen volume was 1.9 ± 1.3 (0.1–5.5) ml in non-mosaic KS patients (47,XXY) and 1.5 ± 1.2 (0.05–4.00) ml in patients with a mosaic form of a KS, respectively, pH semen – 7.8 ± 0.5 (6.5–9.0) and 7.8 ± 0.2 (7.5–8.1), sperm count – 0.27 ± 1.42 (0.00–12.50) and 0.12 ± 0.28 (0.00–0.90) million/ml, respectively. The viscosity was increased (>20 mm) at 41 % non-mosaic KS (group 1) and 22 % of mosaic KS (group 2) patients. The ejaculate sediment was investigated by quantitative karyological analysis of immature germ cells. The germ cells in 42 % samples of the ejaculate of the patients with a classical form of a KS and in 20 % samples of the ejaculate of the patients with a mosaic form was found. That indicates a partial preservation of spermatogenesis.

Conclusion. The degree of spermatogenesis depletion in KS patients widely varied, ejaculate and germ cell parameters in the ejaculate sediment weren't significantly different. Presence of few sperms (cryptozoospermia) and immature cells in the ejaculate sediment point to partial preservation of spermatogenesis.

Key words: Klinefelter syndrome, male infertility, azoospermia, spermatogenesis, spermatozoa, immature germ cells, ejaculate

For citation: Shtaut M.I., Sorokina T.M., Kurilo L.F., Chernykh V.B. Spermatological characteristics of mosaic and non-mosaic forms of Klinefelter syndrome. *Andrologiya i genital'naya khirurgiya = Andrology and Genital Surgery* 2019;20(4):12–6. (In Russ.).

Введение

Синдром Клайнфельтера (СК) – одно из частых хромосомных заболеваний человека [1]. Частота СК составляет 1 случай на 500–600 мужчин [2, 3]. Генетической причиной заболевания является наличие в кариотипе одной или нескольких дополнительных X-хромосом (наиболее частый кариотип 47,XXY). Анеуплоидия может возникнуть уже в зиготе вследствие передачи дополнительной X-хромосомы сперматозоидом или яйцеклеткой, участвовавшими в оплодотворении, из-за нерасхождения половых хромосом в мейозе I у отца (X–Y) или в мейозе I или II у матери (X–X). Реже анеуплоидия по половым хромосомам, характерная для СК, может возникнуть на ранних стадиях развития эмбриона, на стадиях деления дробления, в этих случаях она может привести к мозаицизму по половым хромосомам и развитию мозаичной формы СК.

Пациенты с СК имеют характерные клинические признаки, в том числе гипоплазию тестикул, гипергонадотропный гипогонадизм, высокий рост, евнухоидный тип телосложения, гинекомастию, снижение либидо, бесплодие, азооспермию или олигозооспермию. Патозооспермия обусловлена выраженным нарушением сперматогенеза, вплоть до отсутствия герминативных клеток в извитых семенных канальцах. У многих мозаиков с кариотипом 46,XY/47,XXY фенотипические проявления СК более мягкие, часто характеризуются умеренно выраженными нарушениями репродуктивной функции и сперматогенеза или даже их отсутствием при низкоуровневом мозаицизме по клону клеток с кариотипом 47,XXY [1]. Однако влияние цитогенетического варианта СК на его фенотипические проявления, в том числе сперматологические нарушения, недостаточно изучено.

Цель данного исследования – оценить влияние цитогенетического варианта СК на параметры эякулята у пациентов с СК.

Материалы и методы

Обследованная выборка пациентов состояла из 85 мужчин с СК. В 1-ю группу вошли 75 пациентов

в возрасте 17–39 лет с немозаичной формой СК (кариотипом 47,XXY), во 2-ю группу – 10 мужчин в возрасте от 22 до 57 лет, у которых выявлен мозаичный вариант СК: 47,XXY/46,XY ($n = 9$), 48,XXY,der(X)/47,XXY/46,XY ($n = 1$).

У всех пациентов выполняли стандартный спермиологический анализ в соответствии с руководством Всемирной организации здравоохранения (2010) [4], а также количественный кариологический анализ незрелых половых клеток (ККА НПК) в осадке эякулята [5]. Данный метод позволяет оценивать состояние сперматогенеза и выявлять его нарушения на различных стадиях без проведения биопсии яичка. Детально методика ККА НПК описана ранее [6].

Гистологические препараты получены из биоптатов гонад 3 пациентов с СК (возраст 28, 20, 13 лет) с кариотипом 47,XXY. Образцы фиксировали в смеси Клиланда (Cleland), содержащей 60 частей насыщенного раствора пикриновой кислоты, 20 частей 40 % формальдегида, 10 частей уксусной кислоты, с добавлением перед использованием 0,25 г фиксатора оксида хрома (CrO_3) на 25 частей. После фиксации материала выполняли его обезвоживание в спиртах восходящей концентрации. Готовили гистологические срезы толщиной 6–8 мкм, окрашивая их гематоксилином Эрлиха и 1 % эозином.

Статистический анализ данных выполняли с использованием программы StatSoft Statistica 8 (Dell Technologies, США). Сравнительный анализ результатов выполняли с применением U-критерия Манна–Уитни. Статистически значимыми считали различия при уровне вероятности $p < 0,01$.

Результаты

Олигоспермия, т.е. объем эякулята менее нормативных значений ($< 1,5$ мл), выявлена в 41 % исследованных образцов семенной жидкости пациентов с регулярной формой СК и в 50 % образцов семенной жидкости пациентов с мозаичной формой СК. Повышенная (> 20 мм) вязкость отмечена в 41 и 22 % образцов 1-й и 2-й групп соответственно. Концентрация

Таблица 1. Результаты стандартного спермиологического исследования у пациентов с синдромом Клайнфельтера, $M \pm m$ (min–max)

Table 1. Results of a standard semen analysis in patients with Klinefelter syndrome, $M \pm m$ (min–max)

Группа пациентов Patient group	Объем эякулята, мл Ejaculate volume, ml	pH	Вязкость эякулята, мм Ejaculate viscosity, mm	Количество лейкоцитов в эякуляте, млн Ejaculate leukocyte count, million	Концентрация сперматозоидов, млн/мл Sperm count, million/ml
Пациенты с кариотипом 47,XXY ($n = 75$) Patients with 47,XXY karyotype ($n = 75$)	$1,89 \pm 1,26$ (0,10–5,50)	$7,8 \pm 0,5$ (6,5–9,0)	$21,90 \pm 18,50$ (2,00–80,00)	$0,55 \pm 0,92$ ($n = 47: 0,05–6,04$)	$0,27 \pm 1,42$ (0,00–12,50)
Пациенты с мозаичным кариотипом ($n = 10$) Patients with mosaic karyotype ($n = 10$)	$1,49 \pm 1,17$ (0,05–4,00)	$7,8 \pm 0,2$ (7,5–8,1)	$17,60 \pm 24,70$ (2,00–70,00)	$0,30 \pm 0,20$ ($n = 3: 0,10–0,50$)	$0,12 \pm 0,28$ (0,00–0,90)

сперматозоидов составила $0,27 \pm 1,42$ (0,00–12,50) и $0,12 \pm 0,28$ (0,00–0,90) млн/мл, рН семенной жидкости – $7,8 \pm 0,5$ (6,5–9,0) и $7,8 \pm 0,2$ (7,5–8,1) у пациентов 1-й и 2-й групп соответственно (табл. 1).

В 42 % образцов осадка эякулята пациентов с регулярной формой СК и в 20 % образцов осадка эякулята пациентов с мозаичной формой СК при ККА НПК обнаружены половые клетки (рис. 1), что указывает на частичное сохранение сперматогенеза. ККА НПК проведен у 54 пациентов. Выполнение этого исследования было невозможным у остальных пациентов вследствие недостатка материала (табл. 2).

Обсуждение

Полученные данные свидетельствуют о нарушении сперматогенеза у пациентов с СК. Необструктивная азооспермия выявлена лишь у некоторых пациентов, криптозооспермия встречалась чаще. Нормальная концентрация лейкоцитов, а также нормальная вязкость эякулята наблюдались у большинства мужчин, что свидетельствует о невоспалительном характере

нарушений. Механизм нарушений сперматогенеза многофакторный.

При СК возможна гибель сперматогониев, а кроме того, предполагается, что дополнительная X-хромосома во время профазы I мейоза мешает прохождению кроссинговера, но части половых клеток удается преодолеть этот этап. В тестикулярной ткани у пациентов с СК присутствуют продукты экспрессии генов, которые содержатся на Y-хромосоме, в том числе и продукты, отвечающие за сперматогенез. X-хромосома также содержит гены, влияющие на мужское развитие. Но гены, которые экспрессируются в яичках, расположены как на аутосомных хромосомах, так и на половых; при всех профилях экспрессии копияность генов изменена как в тестикулярной ткани, так и в других, например в клетках Сертоли. В исследованных образцах биоптатов тестикул наблюдали признаки выраженного угнетения сперматогенеза (у пациента в возрасте 20 лет обнаружены сперматогонии и сперматоциты I (рис. 3), у пациента в возрасте 28 лет отсутствуют все стадии клеток герминативного эпителия (рис. 5), у пациента

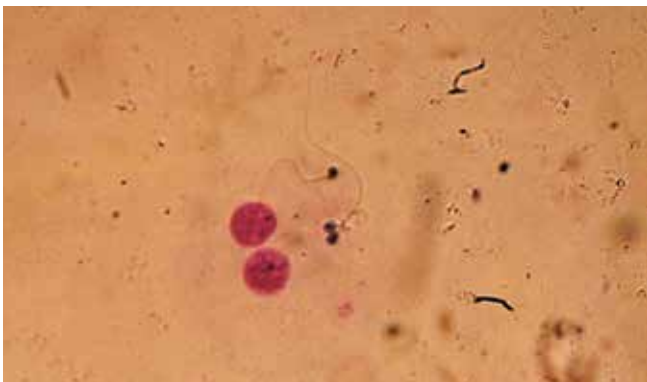


Рис. 1. Сперматозоиды и ядра незрелых половых клеток на стадии зиготены профазы I мейоза у пациента с синдромом Клайнфельтера и криптозооспермией, обнаруженные методом количественного кариологического анализа. Окраска по Романовскому–Гимзе. $\times 1000$

Fig. 1. Spermatozoa and nuclei of immature germ cells at the zygotene stage of prophase I meiosis in a Klinefelter syndrome patient with cryptozoospermia identified by quantitative karyological analysis. Romanovsky–Giemsa staining. $\times 1000$

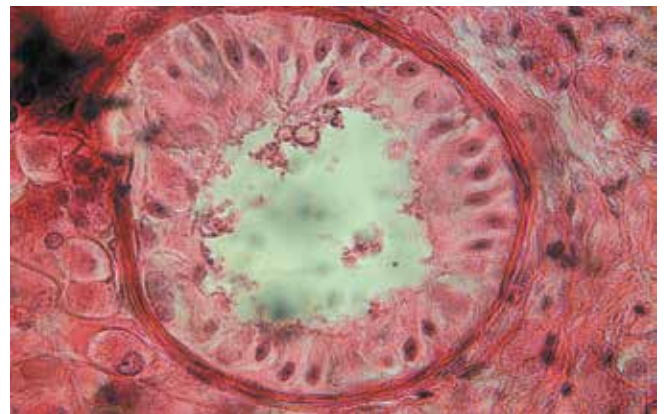


Рис. 2. Фрагмент гистологического препарата биоптата яичка. Поперечный срез извитого семенного канальца пациента в возрасте 20 лет с синдромом Клайнфельтера. Синдром только клеток Сертоли. Окраска гематоксилином Эрлиха и 1 % эозином. $\times 400$

Fig. 2. A fragment of the histological sample of the testis biopsy. Cross section of the seminiferous tubule of 20 years old Klinefelter syndrome patient. Sertoli cell-only syndrome. Ehrlich hematoxylin and 1 % eosin staining. $\times 400$

Таблица 2. Результаты количественного кариологического анализа незрелых половых клеток у пациентов с синдромом Клайнфельтера, $M \pm m$ (min–max)

Table 2. Results of quantitative karyological analysis of immature germ cells in Klinefelter syndrome patients, $M \pm m$ (min–max)

Группа пациентов Patient group	Количество сперматозоидов в осадке эякулята Sperm count in ejaculate sediment	Количество незрелых половых клеток в осадке эякулята Immature germ cell count in ejaculate sediment	Доля сперматоцитов II и сперматид от общего числа незрелых половых клеток, % Percentage of spermatocytes II and spermatids in total germ cell count, %
Пациенты с кариотипом 47,XXY ($n = 47$) Patients with 47,XXY karyotype ($n = 47$)	45 ± 114 (0–700)	136 ± 171 (2–622)	92 ± 13 (26–100)
Пациенты с мозаичным кариотипом ($n = 7$) Patients with mosaic karyotype ($n = 7$)	67 ± 91 (0–197)	–	96 ± 7 (84–100)

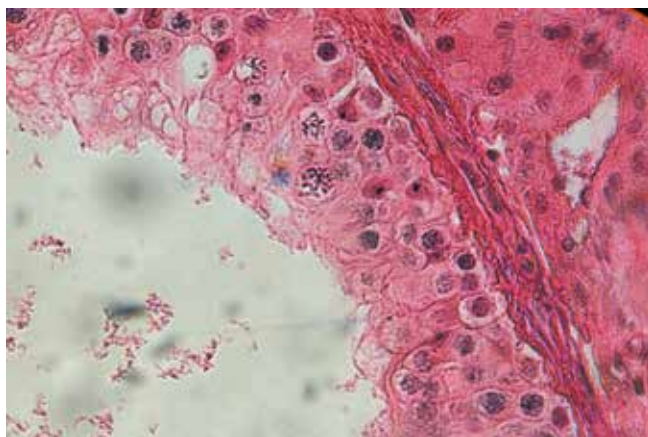
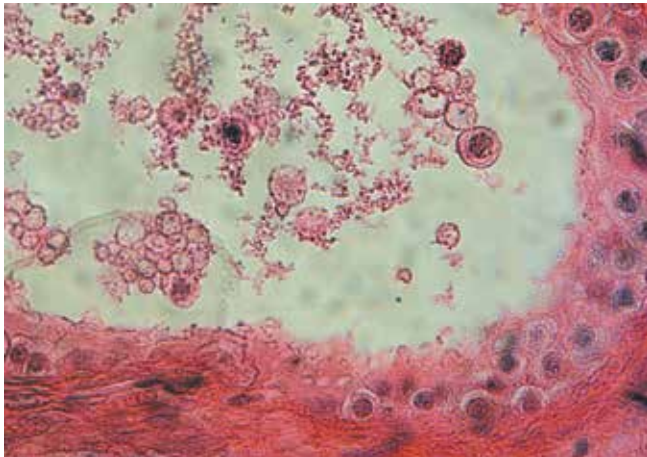


Рис. 3. Фрагмент гистологического препарата биоптата яичка. У пациента с синдромом Клайнфельтера (20 лет) несколько извитых семенных канальцев, в которых обнаружены сперматогонии и сперматозоиды I. Окраска гематоксилином Эрлиха и 1 % эозином. ×400

Fig. 3. A fragment of the histological sample of the testis biopsy. A patient with KS (20 years old) has several seminal tubules in which spermatogonia and spermatozoa I. Ehrlich hematoxylin and 1 % eosin staining. ×400

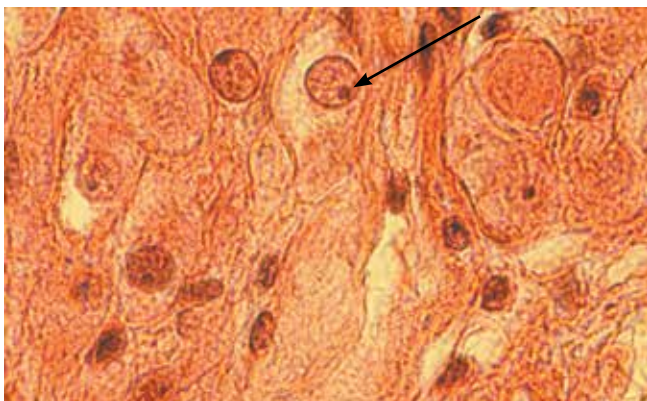


Рис. 4. Фрагмент гистологического препарата биоптата яичка. У пациента с синдромом Клайнфельтера (20 лет) в интерстициальном пространстве — клетки Лейдига, в их ядрах заметны тельца Барра (указаны стрелкой). Окраска гематоксилином Эрлиха и 1 % эозином. ×400

Fig. 4. A fragment of the histological sample of the testis biopsy. Leydig cells in the interstitial space in a 20-year-old patient with Klinefelter syndrome. Ehrlich hematoxylin and 1 % eosin staining. ×400

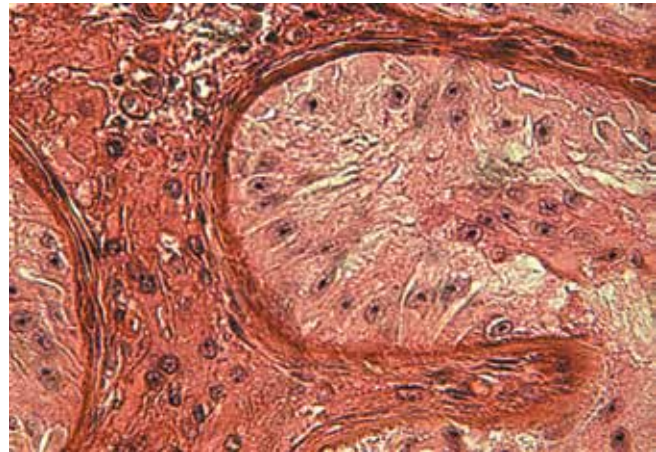


Рис. 5. Фрагмент гистологического препарата биоптата яичка. Срез извитого семенного канальца пациента с синдромом Клайнфельтера, с азооспермией (28 лет). Внутри извитых семенных канальцев — клетки Сертоли, снаружи, в интерстициальном пространстве, — ядра клеток Лейдига. Половые клетки не обнаружены. Окраска гематоксилином Эрлиха и 1 % эозином. ×400

Fig. 5. A fragment of the histological sample of the testis biopsy. Cross section of a seminiferous tubule of a 20-year-old azoospermic Klinefelter syndrome patient. Sertoli cells are visualized inside the tubule, the interstitial space contains Leydig cell nuclei. Germ cells were not observed. Ehrlich hematoxylin and 1 % eosin staining. ×400

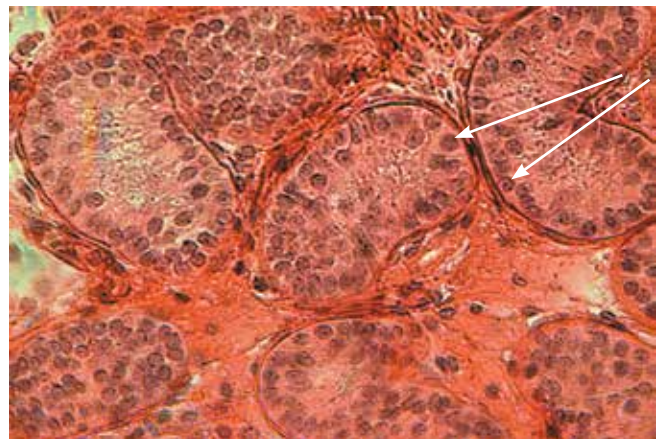


Рис. 6. Фрагмент гистологического препарата биоптата яичка. Извитые семенные канальца пациента с синдромом Клайнфельтера (13 лет), стрелки указывают на ядра клеток Сертоли. Половые клетки не обнаружены. Окраска гематоксилином Эрлиха и 1 % эозином. ×400

Fig. 6. A fragment of the histological sample of the testis biopsy. Seminiferous tubules of a 13-year old patient with Klinefelter syndrome. Arrows point at Sertoli cell nuclei. Germ cells are lack. Ehrlich hematoxylin and 1 % eosin staining. ×400

в возрасте 13 лет извитые семенные канальцы меньшего размера, половые клетки в них отсутствуют (рис. 6)). Страдают морфологические структуры в клетках Сертоли и Лейдига, их функции, сокращается выделение в среду соответствующих соединений из клеток (рис. 2–6). Нарушение функционирования фетальных клеток Лейдига ведет к недостаточной маскулинизации, что может не сопровождаться видимым нарушением формирования яичек (либо отмечают тестикулярный дисгенез в мягкой

форме). Кроме того, клетки Лейдига влияют на фенотип через синтез антимюллера гормона.

Группы пациентов с немозаичной и мозаичными формами СК не различались статистически значимо ни по сперматологическим параметрам, ни по количеству сперматозоидов и доле сперматид от общего числа незрелых половых клеток в осадке эякулята; разные степени сохранности сперматогенеза встречались у пациентов и с немозаичной, и с мозаичными формами СК, что, вероятно, объясняется разнородностью исследованной выборки.

Заключение

Степень выраженности нарушений сперматогенеза варьировала от олигозооспермии до азооспермии. Сперматологические показатели и результаты ККА НПК в осадке эякулята у пациентов с мозаичной и немозаичной формами СК статистически значимо не различались. Наличие немногочисленных сперматозоидов (криптозооспермия) и незрелых половых клеток в осадке эякулята указывает на частичное сохранение сперматогенеза.

REFERENCES / ЛИТЕРАТУРА

1. De Braekeleer M., Dao T.N. Cytogenetic studies in male infertility: a review. *Hum Reprod* 1991;6(2):245–50.
2. Козлова С.И., Демикова Н.С., Семанова Е.В., Блиникова О.Е. Наследственные синдромы и медико-генетическое консультирование. М.: Практика, 1996. 416 с. [Kozlova S.I., Demikova N.S., Semanova E.V., Blinnikova O.E. Hereditary syndromes and medical genetic counseling. Moscow: Praktika, 1996. 416 p. (In Russ.)].
3. McKinlay Gardner R.J., Amor D.J. Chromosomal abnormalities and genetic counseling. 5th edn. Oxford: Oxford University Press, 2018. 728 p.
4. Руководство ВОЗ по исследованию и обработке эякулята человека. Пер. с англ. Н.П. Макарова. Науч. ред. Л.Ф. Курило. 5-е изд. М.: Капитал Принт, 2012. 291 с. [WHO Laboratory manual for the examination and processing of human semen. Transl. from English by N.P. Makarov. Scientific ed. by L.F. Kurilo. 5th edn. Moscow: Kapital Print, 2012. 291 p. (In Russ.)].
5. Патент на изобретение № 2328736/10.07.2008. Бюл. № 19. Курило Л.Ф. Способ цитологической диагностики нарушения сперматогенеза. Доступно по: https://yandex.ru/patents/doc/RU2328736C1_20080710. [Patent RUS № 2328736/10.07.2008. Bull. № 19. Kurilo L.F. Method of cytogenetic diagnosis of spermatogenesis violation. Available at: https://yandex.ru/patents/doc/RU2328736C1_20080710. (In Russ.)].
6. Андреева М.В., Хаят С.Ш., Шилейко Л.В. и др. Количественный кариологический анализ незрелых половых клеток из эякулята как часть протокола обследования мужчин с бесплодием в браке. *Андрология и генитальная хирургия* 2017;18(1):62–9. [Andreeva M.V., Khayat S.Sh., Schileiko L.V. et al. Quantitative karyological analysis of immature germ cells from ejaculate as part of examination of patients with infertility in marriage. *Andrologiya i genital'naya khirurgiya = Andrology and Genital Surgery* 2017;18(1):62–9. (In Russ.)]. DOI: 10.17650/2070-9781-2017-18-1-62-69.

Вклад авторов

М.И. Штаут: получение данных для анализа (спермиологическое исследование), анализ полученных данных, написание текста статьи;
Т.М. Сорокина: клиническое обследование пациентов;
Л.Ф. Курило: разработка методов количественного кариологического анализа незрелых половых клеток, научное редактирование текста статьи;
В.Б. Черных: разработка дизайна исследования, клиническое обследование пациентов, анализ полученных данных, обзор публикаций по теме статьи, написание и редактирование текста статьи.

Authors' contributions

M.I. Shtaut: obtaining data for analysis (spermiological examination), analysis of the obtained data, article writing;
T.M. Sorokina: clinical examination of infertile male patients;
L.F. Kurilo: developing the method of quantitative karyological analysis of immature germ cells, scientific editing of the text;
V.B. Chernykh: developing the research design, clinical examination of patients, analysis of the obtained data, reviewing of publications of the article's theme, article writing and editing.

ORCID авторов/ORCID of authors

М.И. Штаут/M.I. Shtaut: <https://orcid.org/0000-0002-0580-5575>
Т.М. Сорокина/T.M. Sorokina: <https://orcid.org/0000-0002-4618-2466>
Л.Ф. Курило/L.F. Kurilo: <https://orcid.org/0000-0003-3603-4838>
В.Б. Черных/V.B. Chernykh: <https://orcid.org/0000-0002-7615-8512>

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Conflict of interest. The authors declare no conflict of interest.

Финансирование. Работа выполнена в рамках государственного задания Минобрнауки России.

Financing. The study was performed within work of the state task of the Ministry of Education and Science of Russia.

Информированное согласие. Все пациенты подписали информированное согласие на участие в исследовании.

Informed consent. All patients gave written informed consent to participate in the study.

Статья поступила: 28.08.2019. **Принята к публикации:** 01.11.2019.

Article received: 28.08.2019. **Accepted for publication:** 01.11.2019.