

VARIAȚII CROMOZOMIALE LA BĂRBAȚII INFERTILI

¹Stela RACOVITĂ - doctorand, asist. univ., ¹Svetlana CAPCELEA - dr. în șt. med., conf. univ.,

¹Veaceslav MOȘIN - dr. hab. med., prof. univ., ²Elena HALABUDENCO - medic genetician,

²Ana MIȘINA - medic citogenetician, ²Tatiana SAMOILENCO - medic citogenetician,

^{1,2}Svetlana HADJIU - prof. univ., dr. hab. în șt. med. ^{1,2}Mariana SPRINCEAN - dr. în psihol., conf. univ.

¹USMF Nicolae Testemițanu, Republica Moldova

²IMSP Institutul Mamei și Copilului, Republica Moldova

tel.: +373-69-580-223, stela.racovita@usmf.md

Rezumat.

Introducere: Infertilitatea masculină prezintă etiologie heterogenă, cel mai frecvent fiind cauzată de tulburările de spermatogeneză. Cele mai comune cauze genetice la bărbații cu spermograma sever afectată sunt anomaliile cromozomiale.

Obiectiv: Studiarea variațiilor cromozomiale la bărbații infertili pentru confirmarea importanței investigații citogenetice a bărbaților cu spermograma sever afectată.

Materiale și metode: Cercetarea prezintă un studiu descriptiv prospectiv pe un lot de 1432 de bărbați infertili, din populația Republicii Moldova pe parcursul anilor 2017-2018. La toți pacienții a fost efectuată spermograma. La 44 pacienți cu spermograma sever afectată au fost investigați citogenetic prin tehnica clasică de marcaj G. Pentru raportarea rezultatelor a fost utilizată nomenclatura conform ISCN (*International System of Cytogenetic Nomenclature*) 2016.

Rezultate: Din numărul total de 1432 de bărbați investigați 766 (53,5%) au prezentat valori normale ale materialului seminal - normozoospermie și 666 (46,5%) au prezentat tulburări de spermatogeneză. Din numărul total de 44 bărbați infertili cu spermograma sever afectată, 33 au prezentat cariotip normal 46,XY (75%) și 11 (25%) au prezentat variații de număr sau structură a cromozomilor. 8 pacienți (18%) au prezentat variații în cromozomii sexuali X sau Y, iar 3 pacienți (8%) variații ale cromozomilor autozomi.

Concluzie: Ponderele anomaliilor cromozomiale identificate în lotul bărbaților infertili cu spermograma sever afectată a fost de 25%. Investigarea citogenetică este importantă pentru diagnosticul etiologic, managementul și sfatul genetic acordat cuplurilor cu probleme de infertilitate inclusiv, candidate la tehnicile de reproducere asistată.

Cuvinte-cheie: variații cromozomiale, bărbați, infertilitate, cariotip

Summary. Chromosomal variations in infertile man.

Introduction: Infertility in men has a heterogeneous etiology, most commonly caused by spermatogenesis disorders. The most common genetic causes in men with severe seminogram disorders are chromosomal abnormalities.

Objectives: Study of chromosomal variations in infertile men aimed to confirm the importance of cytogenetic investigation of men with severe seminogram disorders.

Materials and methods: The presented work is a prospective descriptive study on a group of 1432 infertile men originated from the Republic of Moldova during the years 2017 – 2018. In all patients the seminogram was carried out. In 44 patients with severe seminogram disorders, cytogenetic investigations were administered using the classical G banding technique. To report the results was used *The International System of Cytogenetic Nomenclature*, 2016 (ISCN).

Results: Of the total number of 1432 men investigated in 766 (53,5%) were determined normal values on seminogram, i. e. normozoospermia and 666 (46,5%) had spermatogenesis disorders. Of the total number of 44 infertile men with severely impaired seminogram, 33 had normal karyotype 46,XY (75%) and 11 (25%) have shown variations in the number or structure of chromosomes. 8 patients (18%) had variations in sex chromosomes X or Y, and 3 patients (8%) had variations in autosomal chromosomes.

Conclusion: The share of chromosomal abnormalities identified in the group of infertile men with severely impaired seminogram was 25%. Cytogenetic investigation is important for etiological diagnosis, management and genetic counseling for the couples with reproductive problems including for candidates for assisted reproductive techniques.

Key-words: chromosomal variations, men, infertility, karyotype.

Резюме. Хромосомные aberrации у мужчин с бесплодием.

Введение: Мужское бесплодие – патология с гетерогенной этиологией, наиболее часто связанная с нарушениями сперматогенеза. Наиболее частые генетические причины тяжелых нарушений спермограммы – хромосомные aberrации.

Цель: Изучение хромосомных вариантов у мужчин с бесплодием для подтверждения важности цитогенетических исследований при тяжелых нарушениях спермограммы.

Материалы и методы: Представленная работа содержит результаты описательного проспективного исследования группы 1432 мужчин с бесплодием из Республики Молдова за 2017 – 2018 гг. У всех пациентов была обследована спермограмма. У 44 пациентов с тяжелыми нарушениями спермограммы было выполнено цитогенети-

ческое исследование с классическим G-окрашиванием хромосом. При сообщении результатов была использована номенклатура ISCN (*International System of Cytogenetic Nomenclature*), 2016.

Результаты: Из общего числа 1432 обследованных мужчин у 766 (53,5%) были нормальные значения спермы – нормозооспермия, а у 666 (46,5%) были нарушения сперматогенеза. Из общего числа 44 мужчин с бесплодием и тяжёлыми нарушениями спермограммы у 33 был нормальный кариотип 46,XY (75%) и у 11 (25%) были вариации числа или структуры хромосом. У 8 пациентов (18%) были вариации половых хромосом X или Y, у 3 пациентов (8%) были вариации аутосом.

Заключение: Доля выявленных хромосомных аномалий в группе пациентов с тяжёлыми нарушениями спермограммы составила 25%. Цитогенетические исследования важны для этиологической диагностики, ведения и генетического консультирования пар с репродуктивными нарушениями, в том числе кандидатов для применения методов вспомогательной репродукции.

Ключевые слова: хромосомные аберации, мужское бесплодие, кариотип.

Introducere.

Infertilitatea masculină (IM) reprezintă o colecție de condiții heterogene, fiind cauzată cel mai frecvent de tulburările de spermatogeneză. IM se manifestă clinic prin astenozoospermie, teratozoospermie, oligospermie și azoospermie în proporție de 75% [1]. Etiologia producerii și funcției de spermă afectată poate fi legată de diferiți factori congenitali sau dobândiți, care acționează la nivel pre-testicular, post-testicular sau direct la nivel testicular. În ciuda multor tehnici avansate care au îmbunătățit abilitățile de diagnostic, etiopatogeneza eșecului testicular rămâne necunoscută în circa 50% din cazuri și este denumită „infertilitate idiopatică” [2].

Factorii genetici pot fi identificați în fiecare dintre cele trei categorii de la nivel pre-testicular, testicular și post-testicular, aceasta se explică prin implicarea numărului impunător de gene în proporție de 2000 care se exprimă în țesutul testicular, ce controlează diferențierea organelor sexuale, homeostazia hormonală, spermatogeneza [3]. Cele mai frecvente cauze genetice la bărbații cu spermograma sever afectată sunt anomaliile cromozomiale și frecvența lor este invers corelată cu concentrația de spermatozoizi. Pacienții cu număr redus de spermatozoizi și azoospermie non-obstructivă prezintă un risc crescut pentru anomaliile cromozomiale. Prevalența anomaliilor cromozomiale în populația generală a bărbaților infertili variază de la 2% până la 7%, ceea ce reprezintă o creștere de 8-10 ori, în comparație cu grupul de nou-născuți neselectați [4]. În grupurile de pacienți cu oligozoospermie moderată anomaliile cromozomiale sunt detectate în aproximativ 4% [5]. În timp ce la pacienții azoospermici prevalența variațiilor cromozomiale a fost raportată între 15 și 25%, în funcție de subgrup a bărbaților azoospermici studiați [6]. Datorită frecvenței înalte a anomaliilor cromozomiale în rândul bărbaților cu azoospermie non-obstructivă și oligozoospermie moderată, cariotipul este primul test genetic care trebuie efectuat la pacienții cu tulburări de spermatogeneză cantitative. În plus, acest test

genetic este indicat bărbaților cu istoric familial de avorturi recurente, malformații, tulburări cognitive de dezvoltare sau infertilitate indiferent de concentrația de spermă [5].

Obiectiv: Studiarea variațiilor cromozomiale la bărbații infertili pentru confirmarea importanței investigației citogenetice a bărbaților cu spermograma sever afectată.

Materiale și metode: Cercetarea prezintă un studiu descriptiv prospectiv pe un lot de 1432 de bărbați infertili, din populația Republicii Moldova pe parcursul anilor 2017-2018. Pacienții provin din cuplurile infertile ce s-au adresat în cadrul Centrului Național de Sănătate a Reproducerii și Genetică Medicală. La toți pacienții a fost efectuată spermograma realizată după o perioadă de 2-7 zile de abțință sexuală, conform criteriilor de referință a analizei spermei din 2010 a Organizației Mondiale a Sănătății (OMS).

La 44 pacienți cu spermograma sever afectată au fost investigați citogenetic prin tehnica clasică de marcaj G, pe limfocite din sângele periferic fiind analizate 15 metafaze dintre care 5 cariotipate. Pentru raportarea rezultatelor a fost utilizată nomenclatura conform ISCN (*International System of Cytogenetic Nomenclature*) 2016.

Rezultate: În departamentul Centrului Național de Sănătate a Reproducerii și Genetică Medicală, pe parcursul anilor 2017-2018 a fost realizată spermograma la 1432 de bărbați infertili (*tabelul 1*). Din numărul total de 1432 de bărbați investigați 766 (53,5%) au prezentat valori normale ale materialului seminal - normozoospermie și 666 (46,5%) au prezentat tulburări de spermatogeneză. Cea mai frecventă anomalie a spermatogenezei a fost înregistrată astenozoospermia la 306 bărbați cu o frecvență de 21,3%. Urmată de oligozoospermia fiind diagnosticată la 271 bărbați în 21,0%. La 89 bărbați a fost înregistrată azoospermia, frecvența fiind de 6,3%. (*figura 1*).

Din numărul total de 44 bărbați infertili cu spermograma sever afectată, 33 au prezentat cariotip nor-

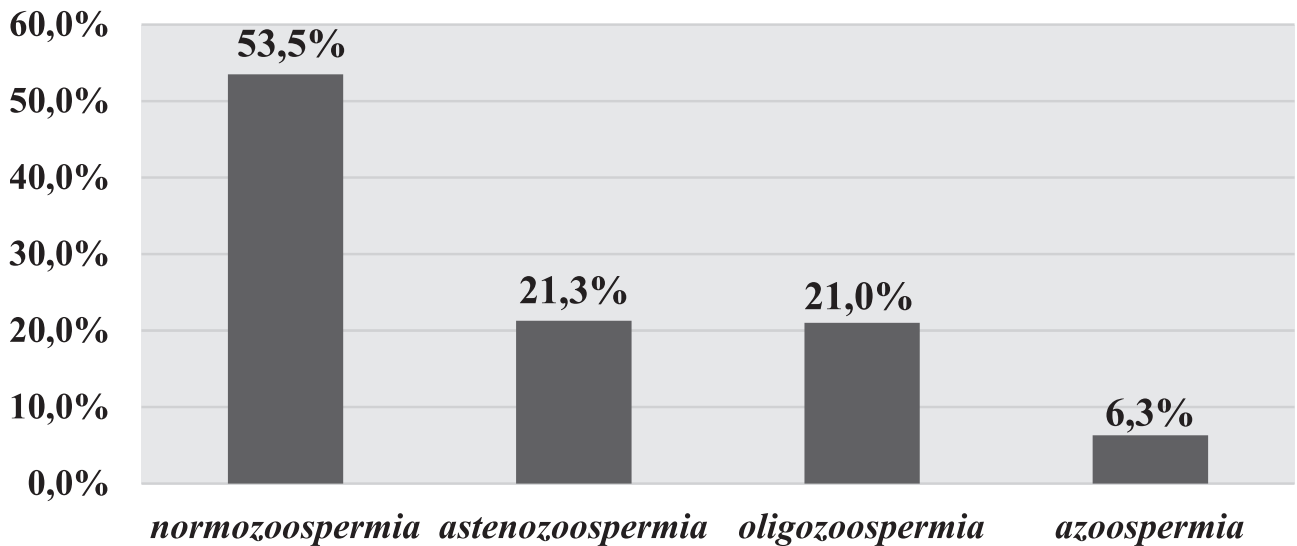


Figura 1. Distribuția rezultatelor analizei spermogramei diagnosticate în perioada anilor 2017-2018.

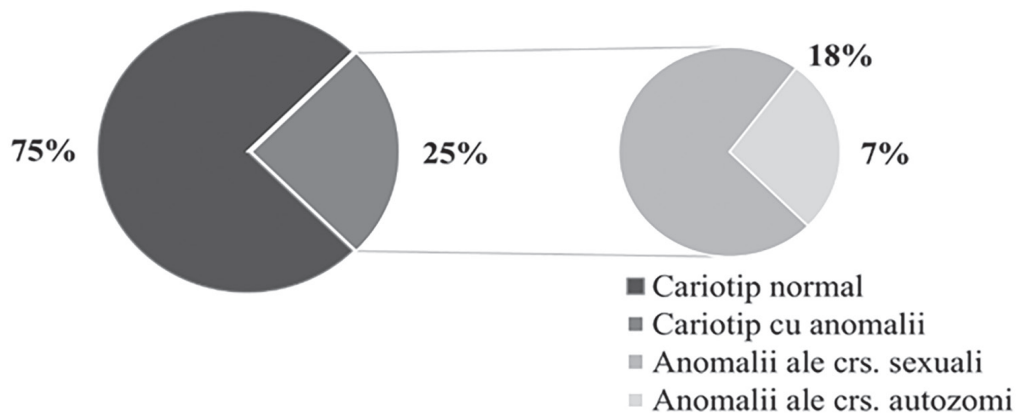


Figura 2. Frecvența bărbaților infertili pe anomalii cromozomiale, anii 2017- 2018

mal 46,XY (75%), (figura 1) și 11 (25%) au prezentat variații de număr sau structură a cromozomilor. 8 pacienți (18%) au prezentat variații în cromozomii sexuali X sau Y, iar 3 pacienți (8%) variații ale cromozomilor autozomali (figura 2).

La cei 8 pacienți identificați cu anomalii cromozomiale de sex în 5 cazuri au fost depistate anomalii cromozomiale de număr și în 3 cazuri - variații de structură. Dintre anomaliile cromozomiale de număr în toate 5 cazuri au fost identificate aneuploidii X (Sindromul Klinefelter), în 4 cazuri forma clasică 47,XXY și un caz forma mozaică 47,XXY/46,XY (80/20%). Variațiile de structură a cromozomilor sexuali depistate au fost în 3 cazuri duplicații ale brațului distal al cromozomului Y - 46,XYqh+ (figura 3), (tabelul 1).

Cea mai frecventă variantă citogenetică a Sindromului Klinefelter identificată a fost forma clasică 47,XXY în 4 cazuri (80%) (figura 2), urmată de forma: mozaică 47,XXY/46,XY un caz (20%). Toate

cazurile au fost diagnosticate la vârsta postpubertară de 30-35 de ani.



Figura 3. Cariotip 47,XXY Sindromul Klinefelter forma clasică, la pacient de 31 de ani.

Tabelul 1.

Repartizarea bărbaților infertili pe anomalii cromozomiale

Cariotip	Nr. pacienților (n=11)	Fenotip
47,XXY	4	Azoospermie
47,XXY/46,XY(80%/20%)	1	Azoospermie
46,XYqh+	1	Azoospermie
46,XYqh+ (Yqh≤18q)	1	Azoospermie
46,XYqh+ (Yqh<18q)	1	Azoospermie
46,XY,der(7),t(12;7)(12qter::7p21→pter)	1	Azoospermie
46,XY,15ps+	1	Oligozoospermie
46,XY,21ps,13ps	1	Oligozoospermie

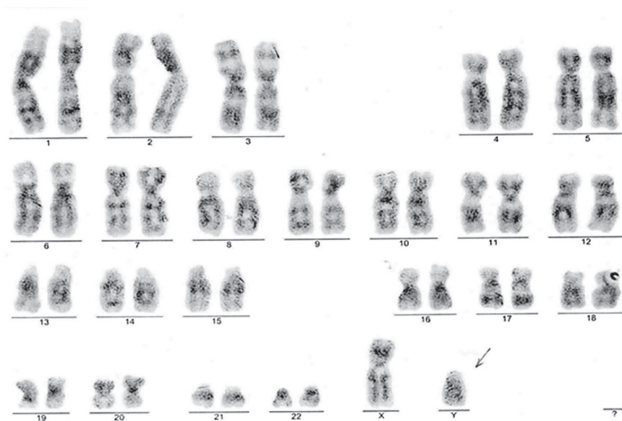


Figura 4. Cariotip 46,XYqh+ la bărbat cu azoospermie, 36 de ani.

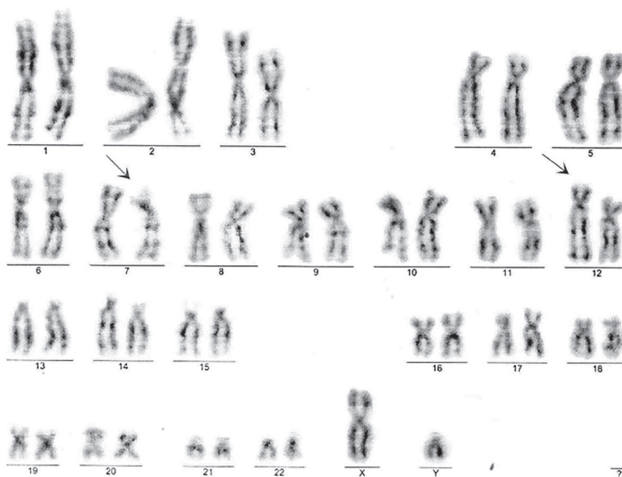


Figura 5. Cariotip 46,XY,der(7),t(12;7)(12qter::7p21→pter) la bărbat cu azoospermie, vârsta 30 de ani

În 3 cazuri au fost depistate variații ale cromozomilor autozomi, un caz la bărbat cu azoospermie s-a identificat translocăție reciprocă echilibrată 46,XY,der(7),t(12;7)(12qter::7p21→pter) (figura 4), în 2 cazuri polimorfisme ale cromozomilor acrocentrici

46,XY,15ps+, 46,XY,21ps,13ps, ambii pacienții cu oligozoospermie (tabelul 1).

Discuții.

Ponderea anomaliilor cromozomiale identificate în lotul bărbaților infertili cu spermograma sever afectată în perioada anului 2017-2018 a fost de 25%. Cele mai frecvente au fost identificate anomaliile cromozomilor sexuali în 18%, iar anomaliile cromozomilor autozomi în 7% (figura 1, tabelul 1). Cele mai multe anomalii cromozomiale au fost depistate la bărbații cu azoospermie în număr de 9, urmată de 2 pacienți cu oligozoospermie. Frecvența înaltă a anomaliilor cromozomiale la bărbații azoospermici este descrisă și în studiile de specialitate. Frecvența anomaliilor cromozomiale fiind invers corelată cu concentrația de spermatozoizi, astfel la bărbații cu azoospermie fiind cele mai frecvente. Se observă în studiul nostru de asemenea că, anomaliile cromozomiale de număr ale cromozomilor sexuali sunt cele mai frecvente la bărbații azoospermici, în timp ce anomaliile structurale autosomale sunt mai frecvente la bărbații cu oligozoospermie [6].

Din 44 bărbați infertili investigați citogenetic 5 au prezentat disomia X cu o frecvență de 11,3%. Această frecvență înaltă a Sindromului Klinefelter printre bărbații infertili este raportată și în sursele bibliografice [7]. Se estimează că sindromul Klinefelter provoacă 1-3% din totalul cazurilor de infertilitate masculină [8]. Rezultatele obținute în studiul nostru sunt similare cu datele din literatură care relatează aceeași incidență înaltă pentru forma clasică 47,XXY a Sindromului Klinefelter. Aproximativ 80-90% dintre pacienții cu sindromul Klinefelter prezintă un cariotip 47,XXY uniform – forma clasică, în care este prezent un cromozom X suplimentar în toate compartimentele somatice și ale celulelor germinale. Restul 10-20% prezintă cromozomi X supranumerari cum ar fi

(48,XXXY; 48,XXYY; 49,XXXXY), sau mozaicism 47,XXY/46,XY, sau cu implicarea anomaliilor de structură ale cromozomului X [9].

Sindromul Klinefelter prezintă diversitate atât citogenetică cât și fenotipică, cu vârsta tabloul clinic se accentuează, astfel diagnosticarea pacienților la vârste timpurii poate fi eșuată. Același fenomen se observă și în studiul nostru (*figura 2*), cele mai multe cazuri au fost diagnosticate postpubertar, ceea ce prezintă un factor nefavorabil pentru rata succesului de recuperare a spermatozoizilor.

Polimorfismele cu implicarea cromozomului Y sunt menționate în studiile privind infertilitatea masculină, în special la bărbații cu azoospermie și oligozoospermie severă. Varianta polimorfă a cromozomului Y– (Yqh+) în studiul nostru a fost diagnosticată la 3 pacienți cu azoospermie (*tabelul 1*). Acest subiect devine din ce în ce mai controversat datorită rolului heterochromatinei, fără a avea o relevanță clinică pe deplin elucidată [10].

Translocațiile reciproce sunt cele mai frecvente anomalii cromozomiale echilibrate, fiind relatate la 0,9 din 1000 nou-născuți și în aproximativ 1% din bărbații infertili [11]. Frecvența translocațiilor reciproce este de nouă ori mai mare la bărbații infertili decât la bărbații sănătoși. În studiul nostru a fost identificată translocația reciprocă echilibrată 46,XY,der(7),t(12;7) (12qter::7p21→pter) la bărbat cu azoospermie. Azoospermia la acești bărbați se datorează prin implicarea a mii de gene autosomale în controlul direct sau indirect a formării testiculelor, funcționării lor și spermatogenezei [12].

Implicarea polimorfismelor cromozomilor acrocentrici 13, 14, 15, 21, 22 în infertilitatea masculină este relatată și în studiile de specialitate. În studiul nostru au fost depistate duplicații în sateliții cromozomilor acrocentrici 13, 15, și 21, la 2 bărbați cu oligozoospermie 46,XY,15ps+ și 46,XY,21ps,13ps (*tabelul 1*). Deși sateliții sunt părți componente de heterocromatină în unele studii a fost demonstrată o corelație pozitivă între frecvența variantelor cromozomilor acrocentrici cu sateliți și sterilitate, datorită asocierii lor cu riscul de non-disfuncție care conduce la gameți cu aneuploidie [13].

Concluzii:

Ponderea anomaliilor cromozomiale identificate în lotul bărbaților infertili cu spermograma sever afectată a fost de 25%. Datele prezentate arată necesitatea explorării citogenetice a oricărui bărbat cu sper-

mograma sever afectată. Analiza cromozomilor este indicată pentru diagnosticul etiologic, managementul și sfatul genetic acordat cuplurilor cu probleme de infertilitate inclusiv, candidate la tehnicile de reproducere asistată.

Bibliografie

- Poongothai J, Gopenath T S, Manonayaki S, Genetics of human male infertility, Singapore Med J 2009; 50(4): 336.
- Lotti F, Maggi M. Ultrasound of the male genital tract in relation to male reproductive health. Hum Reprod Update. 2015;21(1):56–83.
- Krausz C. Male infertility: pathogenesis and clinical diagnosis. Best Pract. Res. Clin. Endocrinol. Metab. 25, 271–285 (2011).
- Krausz C, Riera-Escamilla A. Genetics of male infertility. Vol. 15, Nature Reviews Urology. 2018.
- Pylyp LY, Spinenko LO, Verhogyad N V., Zukin VD. Chromosomal abnormalities in patients with oligozoospermia and non-obstructive azoospermia. J Assist Reprod Genet. 2013;30(5):729–32.
- R.B. Donker V. Vloeberghs H. Groen H. Tournaye C.M.A. van Ravenswaaij-Arts and J.A. Land, Chromosomal abnormalities in 1663 infertile men with azoospermia: the clinical consequences, Human Reproduction, pp. 1–7, 2017.
- Alberto Ferlin, Florina Raicu, Valentina Gatta, Daniela Zuccarello, Giandomenico Palka, Carlo Foresta, Male infertility: role of genetic background, Reproductive BioMedicine Online, Vol 14. No 6. 2007 734-745.
- Lanfranco F., Kamischke A., Zitzmann M., Nieschlag E. (2004) Klinefelter's syndrome. Lancet, 364, 273–283.
- Kamischke A, Baumgardt A, Horst J, Nieschlag E. Clinical and diagnostic features of patients with suspected Klinefelter syndrome. J Androl 2003; 24: 41–48.
- Verp MS, Rzeszotarski MS, Martin AO, Simpson JL. Relationship between Y-chromosome length and first-trimester spontaneous abortions. Am J Obstet Gynecol 1983; 145:433-8.
- Eisa Tahmasbpour & Dheepa Balasubramanian & Ashok Agarwal, A multi-faceted approach to understanding male infertility: gene mutations, molecular defects and assisted reproductive techniques (ART), J Assist Reprod Genet (2014) 31:1115–1137.
- Ferlin A, Arredi B, Speltra E, Cazzadore C, Selice R, Garolla A, et al. Molecular and clinical characterization of Y chromosome microdeletions in infertile men: a 10-year experience in Italy. J Clin Endocrinol Metab. 2007;92:762-770.
- Penna Videau S., Araujo H., Ballesta F., Balleścá J. L., Vanrell J. A. Chromosomal abnormalities and polymorphisms in infertile men, Archives of Andrology, 2001. 46:3, 205-210.