

MINISTERUL SĂNĂTĂȚII AL REPUBLICII MOLDOVA

**IP UNIVERSITATEA DE STAT DE MEDICINĂ ȘI FARMACIE
„NICOLAE TESTEMIȚANU”**

Cu titlu de manuscris

C.Z.U.: 616.697-02:616.69-008.6-07:575.224(043.2)

RACVIȚĂ Stela

**VARIAȚII GENETICE ÎN INFERTILITATEA MASCULINĂ CU
AZOOSPERMIE**

315.02 – BIOLOGIE MOLECULARĂ ȘI GENETICĂ MEDICALĂ

Rezumat la teză de doctor în științe medicale

CHIȘINĂU, 2023

Teza a fost elaborată la Catedra de biologie moleculară și genetică umană a Universității de Stat de Medicină și Farmacie „Nicolae Testemițanu”

Conducător științific

Sprincean Mariana, dr. hab. șt. med., conf. univ.

Conducător prin co-tutelă

Moșin Veaceslav, dr. hab. șt. med., prof. univ.

Membrii comisiei de îndrumare:

Gorduza Eusebiu Vlad, dr. șt. med., prof. univ., Iași, România.

Strătilă Mihail, dr. șt. med., conf. cerc.

Mișina Ana, med. citogenetician.

Suștinerea va avea loc la 14.06.2023, ora 14:00, în ședința Comisiei de susținere publică a tezei de doctorat, din cadrul USMF „Nicolae Testemițanu” (bd. Ștefan cel Mare și Sfânt, 165, biroul 205), aprobată prin decizia Consiliului Științific al Consorțiului (proces verbal nr.4, din 29.03.2023).

Componenta Comisiei de susținere publică a tezei de doctorat:

Președinte:

Groppa Stanislav, academician al AȘM, dr. hab. șt. med., prof. univ.

Membrii:

Moșin Veaceslav, dr. hab. șt. med., prof. univ.

Sprincean Mariana, dr. hab. șt. med., prof. univ.

Barbova Natalia, dr. șt. med., conf. univ.

Referenți oficiali:

Gorduza Eusebiu Vlad, dr. șt. med., prof. univ., Iași, România.

Opalco Igor, dr. șt. med., conf. cerc.

Sacără Victoria, dr. hab. șt. biol., conf. cerc.

Autor

Racoviță Stela

CUPRINS

REPERELE CONCEPTUALE ALE CERCETĂRII	4
1. PARTICULARITĂȚILE INFERTILITĂȚII MASCULINE CU AZOOSPERMIE	6
2. MATERIALE ȘI METODE DE INVESTIGAȚII	6
3. ANALIZA TENDINȚELOR DE MODIFICARE A PARAMETRILOR MATERIALULUI SEMINAL, ANII 2012-2020	9
3.1. Estimarea calității și cantității materialului seminal în întregul eșantion.....	9
3.3. Estimarea calității și cantității materialului seminal în eșantionul cu normozoospermie	11
3.4. Evaluarea rezultatelor spermogramelor, conform OMS 2010	11
4. ASPECTE FENOTIPICE ȘI GENETICE ALE BĂRBAȚILOR CU AZOOSPERMIE	13
4.1. Particularitățile fenotipice ale bărbaților azoospermici cu variații ale cariotipului, deleții AZF, mutații CFTR depistate și fără variații genetice depistate	13
4.2. Variații cromozomiale la bărbații cu azoospermie diagnosticați prin examenul citogenetic..	18
4.2.1 Sindromul Klinefelter (SK) 47,XXY	20
4.2.3 Sindromul de la Chapelle cu inversie de sex, bărbat 46,XX.....	21
4.2.4 Disgenezia gonadică mixtă la bărbat 45,X/46,XY	22
4.2.5 Variații structurale microscopice ale cromozomului Y	23
4.2.6 Variații structurale ale cromozomilor autozomi	23
4.3. Variații în genele AZF și gena CFTR la pacienții cu azoospermie testați molecular-genetic	24
4.3.1 Microdeleții ale cromozomului Y la bărbații cu azoospermie	24
4.3.2 Mutații în gena CFTR la bărbații cu azoospermie	25
4.5. Consultul genetic în cuplurile infertile datorate azoospermiei în contextul procedurii de reproducere asistată.....	26
CONCLUZII GENERALE	28
RECOMANDĂRI PRACTICE.....	29
BIBLIOGRAFIE SELECTIVĂ	29
LISTA ABREVIERILOR.....	30

REPERELE CONCEPTUALE ALE CERCETĂRII

Actualitatea temei și importanța problemei abordate

Sănătatea Reprodusei continuă să rămână o prioritate vitală pentru evoluția umană, ce stă la baza sănătății generale a populației, prosperării și dezvoltării omenirii. Organizația Mondială a Sănătății (OMS) a declarat infertilitatea o problemă globală de sănătate, datorită prevalenței înalte la nivel mondial și, în special, datorită anvergurii consecințelor negative asupra calității vieții [1].

Cercetările epidemiologice, la nivel mondial, estimează că aproximativ 15% dintre cuplurile de vârstă reproductivă se confruntă cu probleme legate de sterilitate și infertilitate, factorul masculin fiind implicat în aproximativ 50% din cazuri [2].

Fondul infertilității masculine fiind extrem de eterogen, cel mai frecvent fiind cauzată de tulburările de spermatogeneză, clinic manifestată prin azoospermie și oligospermie severă. Azoospermia este identificată la 1% în populația masculină, în timp ce frecvența azoospermiei în populația bărbaților infertili variază de la 10 până la 15% [3]. Factorii genetici explică aproximativ 30% dintre cazurile de infertilitate masculină asociate cu azoospermie [4]. Frecvența înaltă fiind justificată prin implicarea numeroaselor gene în controlul sexualizării și reproducției. Dintre multiplele cauze genetice implicate în insuficiență spermatogenică, unele din cele mai relevante clinic sunt: anomaliile cromozomiale; microdelețiile cromozomului Y și mutațiile genei CFTR (gena Receptorului Canalului de Clor). Importanța diagnosticării genetice la bărbații cu azoospermie a crescut semnificativ datorită progreselor în tehnicile de reproducere asistată cum ar fi, injecția intracitoplasmatică de spermă (ICSI) și extragerii microchirurgicale de spermă (microTESE), ce ajută cuplurile infertile să aibă propriii copii biologici [5].

Lipsa unor norme naționale, pentru abordarea multilaterală a infertilității masculine a justificat motivul de a iniția un studiu multidisciplinar cu profesioniști din domeniul geneticii și medicinei reproductive pentru optimizarea metodelor de reproducere asistată la cuplurile cu azoospermie, pentru indicațiile testării genetice, pentru a gestiona în mod corespunzător un cuplu infertil cu azoospermie. Aceste constatări argumentează actualitatea și necesitatea cercetării temei, „Variații genetice în infertilitatea masculină cu azoospermie”, pentru medicina contemporană, cât și pentru cuplurile ce se confruntă cu infertilitatea, care doresc să conceapă copii sănătoși.

Scopul cercetării: Studiarea aspectelor clinice, paraclinice și a variațiilor genetice la bărbații cu azoospermie în vederea optimizării metodelor de reproducere asistată în cuplurile infertile.

Pentru realizarea scopului propus au fost stabilite următoarele obiective:

1. Analiza tendinței de modificare a indicatorilor calitativi și cantitativi a materialului seminal;
2. Evaluarea clinică și paraclinică a bărbaților cu azoospermie, care se adresează în consultul medico-genetic;
3. Testarea citogenetică, molecular-genetică și biochimică a bărbaților cu azoospermie și interpretarea rezultatelor obținute în contextul consultului medico-genetic;
4. Corelarea variațiilor citogenetice și molecular-genetice cu manifestările fenotipice la bărbații cu azoospermie;
5. Optimizarea algoritmului de diagnostic genetic al azoospermiei și metodelor de reproducere asistată în infertilitatea masculină cu azoospermie cauzată de variații cromozomiale, microdeleții Y și mutații CFTR.

Metodologia generală a cercetării

Pentru realizarea obiectivelor au fost efectuate două studii științifice. Studiul descriptiv a fost realizat în baza analizei rezultatelor spermogramei $n=5767$ dintr-un centru de reproducere umană asistată pe parcursul anilor 2012-2020. Acest studiu a permis evaluarea tendinței prin regresia liniară a calității și cantității indicatorilor materialului seminal. Studiul transversal a cuprins evaluarea a $n=96$ pacienți cu azoospermie, unde au fost utilizate metode clinice și paraclinice: consultul medico-genetic; analiza materialului seminal; evaluări hormonale; metode genetice; metode invazive cum ar fi biopsie testiculară, ICSI, FIV. Studiul citogenetic al anomaliilor cromozomiale de număr, de structură echilibrate, polimorfismelor cromozomiale, de asemenea, molecular genetic pentru depistarea diferitor mutații care cauzează infertilitate la bărbați cu azoospermie inclusiv și corelația acestora cu formele de infertilitate asociate ale acestora.

Noutatea științifică importantă soluționată

A fost demonstrată contribuția genetică semnificativă la pacienții cu spermograma sever afectată - azoospermie. Cercetarea a permis identificarea anomaliilor și polimorfismelor cromozomiale, evidențierea unor mutații genice și clasificarea formelor citogenetice și molecular-genetice în corelație cu manifestările fenotipice la pacienții cu infertilitate cauzată de azoospermie.

Valoarea aplicativă a cercetării

În scopul realizării unui diagnostic etiopatogenetic complex al infertilității, bărbații cu azoospermie au fost investigați de o echipă multidisciplinară formată din specialiști în reproducere: ginecologi; urologi; medici geneticieni și citogeneticieni.

Bărbații incluși în investigație au beneficiat de testare a cariotipului pentru evidențierea profilului anomaliilor cromozomiale / polimorfismele cromozomiale, cât și investigarea molecular- genetică pentru identificarea microdelețiilor cromozomului Y, mutațiilor în gena CFTR, implicate în etiologia infertilității masculine, stabilirea corelațiilor acestora cu manifestările fenotipice și a ponderii lor la populația RM.

Au fost inițiate strategii adecvate în consultul bărbaților infertili cu azoospermie, care au inclus toate aspectele privind tipul individual de anomalie, relevanța sa clinică, posibila moștenire, riscul genetic pentru descendenți, oportunitățile de tratament și, la o eventuală sarcină, de diagnostic prenatal.

În contextul intensificării utilizării tehnicilor de reproducere asistată în țara noastră, evaluarea genetică a partenerului masculin infertil este importantă atât pentru selectarea corectă a pacienților pentru acest tratament pentru obținerea rezultatelor maxime, cât și pentru evaluarea riscului genetic. Optimizarea algoritmului de diagnostic genetic în evaluarea bărbaților infertili cu azoospermie cauzate de anomaliile cromozomiale și mutații genice va fi un suport metodologic în vederea optimizării consilierii genetice și va facilita luarea deciziilor informate atunci când cuplul optează pentru o reproducere asistată medical.

Valoarea teoretică a cercetării

Rezultatele obținute în urma realizării studiului vor contribui la îmbunătățirea cunoștințelor teoretice ale tematicii variațiilor genetice în azoospermie în știința medicală din Republica Moldova. Materialul complex ce are la bază subiectul bărbaților cu infertilitate cauzată de azoospermie, având în vedere interconexiunea dintre contribuția atât anomaliilor și polimorfismelor cromozomiale, cât și mutațiilor genice, cu eficientizarea tehnicilor de reproducere asistată a cuplurilor infertile datorate azoospermiei, poate fi utilizat ca suport de curs pentru catedra de biologie moleculară și genetică umană a USMF „Nicolae Testemițanu”, cât și pentru medicii din domeniul medicinei reproductive.

Aprobarea rezultatelor științifice

Aprobarea rezultatelor obținute a fost realizată în corespundere cu etapele fundamentale ale studiului. A fost obținut avizul pozitiv al Comitetului de Etică a Cercetării al USMF „Nicolae Testemițanu” pentru realizarea studiului (proces verbal nr. 48, la nr. 60, din data de 12.04.2018). Rezultatele studiului au fost discutate și aprobate în cadrul ședinței comune a Catedrei de biologie moleculară și genetică umană ale USMF „Nicolae Testemițanu” (procesul verbal nr. 11 din 19.12.2022) și la Seminarul Științific de Profil, 312. Fiziologie, 315. Biochimie și biologie moleculară, specialitățile, 312.01. Fiziologie normală și patologică, 315.01. Biochimie medicală, 315.02. Biologie moleculară și genetica medicală (din 24.02.2023). Aprobarea rezultatelor a fost și în cadrul conferințelor și congreselor științifice naționale și internaționale după cum urmează: Conferința Națională de Pediatrie, 2018, – Actualități în Pediatrie. București, România, 2018; Școala Medicală Pediatrică cu participare internațională ediția VI Iași, 2018; Conferință internațională, European Human Genetics, Milano Italia, 2018; Al V-lea Congres de Genetică Medicală cu participare internațională din România, 2018; Conferința științifică anuală a colaboratorilor și studenților USMF „Nicolae Testemițanu”, Chișinău, 2018; Al XX-lea Congres SNPCAR Societatea de Neurologie și Psihiatrie a Copilului și Adolescentului din România, 2019; Conferință Internațională de Pediatrie Bienala Sibiu-Chișinău, România, 2019; Zilele USMF „Nicolae Testemițanu”, Chișinău, 2019; The 8th International Medical Congress for Students and Young Doctor, Chișinău, 2020; Conferința internațională de inventică „Pro Invent”, Cluj-Napoca, România,

2020; A – IV Conferință Națională a Asociației de Medicină de Laborator din România, 2020; Congresul Consacrat Aniversării a 75-a de la Fondarea USMF „Nicolae Testemițanu”, Chișinău, 2020; Congresul al XXI -lea al SNPCAR, România, 2021; A 13-a Conferință Națională a Asociației Medicilor de Laborator din România, Brașov, 2022; Conferința Internațională de Pediatrie „Actualități în practica pediatrică: provocări și succese”, 2022. Premii de categorie internațională, acordat de Societatea Română de Genetică Medicală, 2019; Laureat al concursului „performanțe în cercetare”, USMF „Nicolae Testemițanu”, 2020; 2 Medalii de Aur, 2 Medalii de Argint, 1 Medalie de Bronz: Saloanele Internaționale de Inventică, 2021; Bursa de Excelență a Guvernului 2022.

Publicații la tema tezei

Au fost publicate 45 lucrări științifice la subiectul tezei, inclusiv: 16 articole, dintre care 5 în reviste din baze de date internaționale, (1 articol în revistă citată SCOPUS); 11 articole în reviste din Registrul Național al revistelor de profil, (categoria B+, B, C); 21 teze în lucrările conferințelor și congreselor științifice internaționale și 8 naționale. Au fost obținute: 1 Brevet de invenție; 12 certificate de inovator; 6 acte de implementare. Implementarea rezultatelor a fost înregistrată în procesul științifico-practic în următoarele subdiviziuni: în procesul științifico-didactic al Catedrei de biologie moleculară și genetică umană a USMF „Nicolae Testemițanu”; în Laboratorul de Genetică Moleculară Centrului Medical Repromed; în Laboratorul de Genetică Moleculară Umană IMSP Institutul Mamei și Copilului.

CONȚINUTUL TEZEI

1. PARTICULARITĂȚILE INFERTILITĂȚII MASCULINE CU AZOOSPERMIE

În acest compartiment sunt analizate aspectele generale ale infertilității masculine cu azoospermie. Se pune accentul pe evidențierea evoluției conceptuale a tematicii date. De asemenea, sunt relevate reperele cursului teoretic și ale celui practic ale azoospermiei. Sunt fundamentate principalele cauze genetice ale azoospermiei: variațiile cromozomiale, microdelețiile cromozomului Y și mutațiile genei CFTR ale azoospermiei, în contextul celor mai noi elaborări științifice în domeniu.

2. MATERIALE ȘI METODE DE INVESTIGAȚII

Pentru valorificarea fiecărui obiectiv al cercetării au fost realizate 2 tipuri de studiu: studiul descriptiv integral și studiul transversal.

1. **Studiul descriptiv** a cuprins cercetarea rezultatelor spermogramei $n=5767$, efectuate pe parcursul anilor 2012–2020. Rezultatele spermogramei au fost extrase din registrul de evidență a analizelor de spermă, din cadrul Instituției Centrului Medical Repromed pentru anii 2012–2020. Regresia liniară a fost utilizată pentru a examina tendințele în timp la parametrii spermei: concentrația spermatozoizilor; motilitatea; morfologie și vitalitate. A fost efectuat un test de analiză a varianței (ANOVA) pentru a vedea dacă există diferențe generale în media parametrilor spermatozoizilor, pentru fiecare an din perioada 2012-2020 și pentru mediane (ANOVA conform Kruskal Wallis). Studiul efectuat a permis evaluarea tendinței de modificare a calității materialului seminal.

2. **Studiul transversal** a fost realizat în perioada anilor 2018 – 2020, pe un eșantion de 96 de bărbați infertili cu azoospermie, cu vârstă mai mare de 18 ani, din cadrul IMSP Institutul Mamei și Copilului, Centrul de Sănătate a Reproducerii și Genetică Medicală și Centrul de Sănătate „Repromed”.

Calcularea lotului reprezentativ s-a efectuat prin aplicarea formulei lui Cochran:

$$n=d[\tilde{\pi}(1-\tilde{\pi})]*(z\alpha/w)^2$$

d - design-efect = 1

$\tilde{\pi} = 0,06$ (conform datelor laboratorului Centrului de Sănătate a Reproducerii și Genetică Medicală ponderea azoospermiei la bărbații cu infertilitate în perioada anului 2013-2017 este în medie 6,0%)

$z\alpha = 1.96$ pentru intervalul de încredere de 95,0%

w – lucrarea a fost efectuată în baza evaluării frecvențelor și aranjarea lor după valorile relative, avem nevoie de intervalul de încredere de 95,0%, $w=0,05$

Introducând datele în formulă, am obținut: $n = 1 * [0,06 * 0,94] * (1,96/0,05)^2 = 87$ și rata de 10,0% de non-răspuns - 96 bărbați infertili cu azoospermie cu respectarea criteriilor de includere și de excludere. După evaluarea examenelor genetice, a fost divizat lotul general în două subloturi: Sublot 1 au inclus bărbații infertili cu azoospermie cu variații genetice și Sublot 2 - bărbații cu azoospermie fără variații genetice prin teste citogenetice și molecular genetice.

Cercetarea științifică a fost realizată consecutiv în cinci etape:

Etapa I - Evaluarea clinică și paraclinică a bărbaților cu infertilitate, ce se adresează pentru consultul medico-genetic de la IMSP Institutul Mamei și Copilului, Centrul de Sănătate a Reproduserii și Genetică Medicală și Centrul de Sănătate „Repromed”.

1. Anamneza masculină (date generale, anamneza familială, a fertilității, pubertală, urogenitală, sexuală, maladii iatrogene, etc.).

2. Evaluarea materialului seminal (confirmarea azoospermiei după minim 2 spermograme, centrifugate, conform cerințelor OMS 2010).

3. Examenul profilului hormonal: (FSH - Hormonul Foliculostimulant, valori de referință (2,0-10,0), unități de măsură (mIU/ml); LH - Hormonul Luteinizant, valori de referință (3,0-12,0), unități de măsură (mIU/ml); Prolactina, valori de referință (1,8-17,0), unități de măsură (ng/ml); Testosteron, valori de referință (2,0-6,9), unități de măsură (ng/ml); Testosteron liber, valori de referință (4,5-42,0), unități de măsură (pg/ml).

4. Metode instrumentale: (ecografie testiculară, transrectală, abdominală).

Etapa II - Selectarea bărbaților infertili cu azoospermie, după obținerea rezultatelor evaluării clinice și paraclinice, care au inclus 96 pacienți.

Criteriile de includere în cercetare a pacienților: semnarea acordului de acceptare pentru participare la cercetare; bărbați cu infertilitate cauzată de azoospermie; vârsta adultă (mai mare sau egală cu 18 ani).

Criterii de excludere din cercetare a pacienților: lipsa acordului de participare la cercetare; bărbați cu infertilitate fără azoospermie; minorii cu vârsta mai mică de 18 ani.

Etapa III - Evaluarea examenului citogenetic și molecular-genetic al bărbaților cu azoospermie.

Examenul citogenetic a avut ca scop analiza variațiilor cromozomilor: evaluarea sexului genetic; anomalii cromozomiale de număr; identificarea unor aneuploidii a cromozomilor sexuali, cum ar fi Sindromul Klinefelter; anomalii ale cromozomilor autosomi, translocațiilor robertsoniene și translocațiilor reciproce; anomalii cromozomiale structurale neechilibrate (delețiilor ale cromozomului Y în regiunea de eucromatină) și echilibrate (delețiilor ale cromozomului Y în regiunea de heterocromatină); polimorfismelor cromozomiale.

Examenul molecular-genetic pentru identificarea microdelețiilor cromozomului Y a fost realizat prin aplicarea metodei multiplex PCR (Reacția de polimerizare în lanț). Prin acest test, utilizând primeri specifici, pot fi detectate delețiile celor 3 regiuni a AZF (AZFa, AZFb, AZFc). Astfel, au fost analizate microdelețiile în 12 loci, dintre care SRY s-a utilizat ca control intern și a permis diagnosticarea bărbaților XX. Secvențele țintă utilizate inițial sunt următoarele sY84 și sY86 (AZFa), sY127 și sY134 (AZFb), sY254 și sY255 (AZFc) și SRY și ZFX/ZFY (pentru control). Conform secvențelor țintă, au fost testate următoarele gene: sY84 - gena DYS 388 și sY86 - gena DYS148; sY127- gena DYS218 și sY13- gena DYS224; sY254 - gena DAZ și sY255 - gena DAZ. Secvențele țintă următoare sunt noi introduse sDBY1 și sY620 (AZFa), sY153 și sY158 (AZFc), sY117 și sY143 (AZFb). Genele testate, datorită amorsoanelor țintă noi introduse, sunt următoarele: sDBY1-gena DBY și sY620-USP9Y; sY153-gena DYS237 și sY158-gena DYS 241; sY117-gena DYS209 și sY143-gena RBM1. Identificarea mutațiilor genei CFTR a fost realizat prin aplicarea metodei PCR – au fost analizate mutațiile - delF508 și G542X. În caz de confirmare a mutației, a fost realizată testarea celuilalt partener pentru evaluarea riscului de recurență la copil. În baza analizei rezultatelor investigațiilor citogenetice și molecular-genetice, lotul de cercetare general de (n=96)

bărbați cu azoospermie a fost divizat în două subloturi, după cum urmează: sublotul 1 a inclus bărbați infertili cu azoospermie cu variații genetice cromozomiale, microdeleții Y și mutații CFTR depistate (n=35); sublotul 2 a inclus bărbați infertili cu azoospermie fără variații genetice cromozomiale, microdeleții Y și mutații CFTR depistate (n=65).

Etapa IV - Prelucrarea statistică a datelor obținute a fost realizată prin efectuarea unor analize de comparație între sublotul 1 – bărbați infertili cu azoospermie confirmată genetic și sublotul 2–, bărbați infertili cu azoospermie neconfirmată etiologie genetică.

Etapa V - Formularea concluziilor și recomandărilor. În baza rezultatelor obținute, au fost elaborate concluzii, recomandări practice, strategii adecvate în consultul bărbaților infertili cu azoospermie, care au inclus toate aspectele, privind tipul individual de anomalie, relevanța sa clinică, posibila moștenire, riscul genetic pentru descendenți și diagnostic prenatal. Recomandările propuse pot fi folosite în scopul optimizării algoritmului de diagnostic genetic al azoospermiei și metodelor de reproducere asistată în infertilitatea masculină cu azoospermie cauzată de variații cromozomiale, microdeleții Y și mutații CFTR.

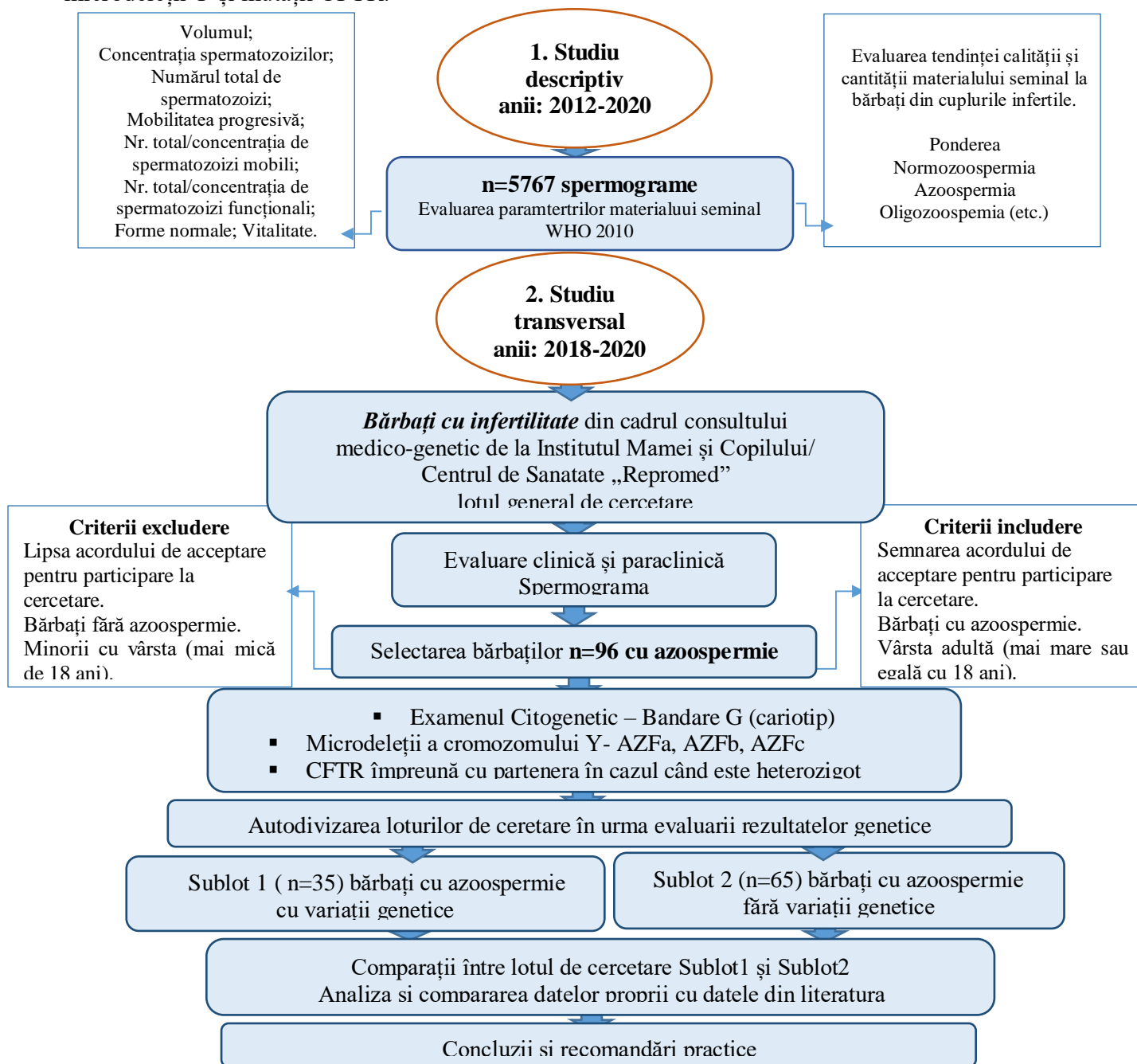


Figura 1. Designul general al studiului

Notă: CFTR- gena receptorului canalului de Clor, AZF- azoospermia factor.

Caracteristica lotului de cercetare (n=5767 spermograme). Au fost analizate rezultatele parametrilor spermogramei (n=5767), efectuate în cadrul unui centru de reproducere pe parcursul anilor 2012-2020. Numărul spermogramelor analizate repartizate pe ani sunt următoarele: 200 în anul 2012, 7003 în 2014, 852 în 2014, 794 în 2015, 703 în 2016, 685 în 2017, 685 în 2018, 630 în 2018, 640 în 2019 și 560 în anul 2020, fapt ce arată că numărul rezultatelor analizate este relativ constant.

Caracteristica lotului de cercetare (n=96, bărbați cu azoospermie). Toți pacienții au fost diagnosticați cu azoospermie după, cel puțin, 2 analize de material seminal. Vârsta medie a bărbaților azoospermici ce se confruntă cu infertilitatea în cuplu pe întregul eșantion (n=96) a fost de $33,8 \pm 5,3$ ani, (ÎI 95%: 32,7 – 34,9; mediana: 33,0). Media istoriei infertilității la întregul eșantion a fost de $6,5 \pm 4,6$ ani, (ÎI 95%: 5,6 – 7,5). Media de vârstă la care s-a diagnosticat infertilitatea pe tot eșantionul este de $27,3 \pm 3,8$ ani, (ÎI 95%: 26,5 – 28,0). Acest fapt, se poate explica datorită că la această vârstă cuplurile mai frecvent planifică să conceapă copii.

Metode de cercetare utilizate

Metodele generale de cercetare: metoda de comparație; metoda analitică; metoda de observație; metoda biostatistică. *Metodele paraclinice, clinico - genetice:* consultul medico-genetic; evaluarea materialului seminal; evaluări hormonale; metode citogenetice, molecular genetice; biopsie testiculară/ICSI/FIV. *Metode de acumulare a datelor - directe:* interviul (anamneza); consultul medico-genetic; îndeplinirea formularului (de către investigator) - *indirecte:* date bibliografice (statistici oficiale, rapoarte, studii, sinteze); extragerea datelor din documentația medicală: Registrul (pe suport de hârtie) de evidență a analizelor de spermă, Instituția Centrul Medical Repromed pentru anii 2012 – 2020, (colectarea parametrilor spermogramei); Formularul Nr. 209/e (rezultatele citogenetice, molecular genetice); Formularul Nr. 235/e (rezultatele markerelor endocrini); Formular Nr. 218/e (analiza la infecții urogenitale (din frotiu)); Formularul Nr. 210/e (examenul sumar al urinei) - Aprobate de Ministerul Sănătății al RM nr. 828 din 31.10.2011, Rapoarte medicale/urologie AOP-F08 (exame primare ale medicilor urologi).

Metode de evaluare statistică

Rezultatele parametrilor materialului seminal ale n=5767 de pacienți, din anii 2012-2020. au fost introduse în baza de date Microsoft Access 2016. Rezultatele clinice și paraclinice ale n=96 pacienților cu azoospermie au fost acumulate în programul Excel 2016. Analiza statistică a datelor pentru ambele baze de date s-a efectuat cu ajutorul programei SPSS 22.0 (SPSS Inc). Au fost utilizate următoarele metode: media aritmetică; devierea standard (DS), intervalul intercuartilă; coeficientul de corelație (Pearson); testul Student; testul χ^2 (chi pătrat; procedura ANOVA; procedura ANOVA după Kruskal-Wallis; regresia liniară simplă și multiplă; analiza de corelație.

3. ANALIZA TENDINTELOR DE MODIFICARE A PARAMETRILOR MATERIALULUI SEMINAL, ANII 2012-2020

3.1. Estimarea calității și cantității materialului seminal în întregul eșantion

La nivel global, nivelul fertilității masculine este în scădere continuă, iar Republica Moldova se înscrie în tendințele europene generale. Studiarea indicatorilor materialului seminal permit descrierea amploarei fenomenului fertilității și sănătății reproductive masculine. Conform OMS, diagnosticul de infertilitate cu implicarea factorului masculin este stabilit atunci când rezultatele analizei repetate ale spermogramei sunt sub valorile normale stabilite de OMS [6]. Calitatea și cantitatea materialului seminal este utilizată ca factor indirect de apreciere a potențialului de fertilitate masculină. Rezultatele evaluării parametrilor materialului seminal la populația masculină (n=5767) demonstrează clar că cantitatea și calitatea materialului seminal scade în perioada de studiu 2012 -2020 [7].

Vârsta medie a bărbaților la momentul realizării spermogramei pe întregul eșantionul (n=5767) a fost de $37,4 \pm 6,3$ ani, (ÎI 95%: 37,3– 37,6; mediana: 37). Rata medie de descreștere anuală a mediei vârstei fiind de 2,1%. Este dificil să afirmăm că adresabilitatea pacienților mai tineri din an în an se datorează creșterii ratei de infertilitate la populația mai tânără sau a conștientizării populației asupra problemei infertilității, dar tendința de micșorare a vârstei este evidentă în perioada de studiu.

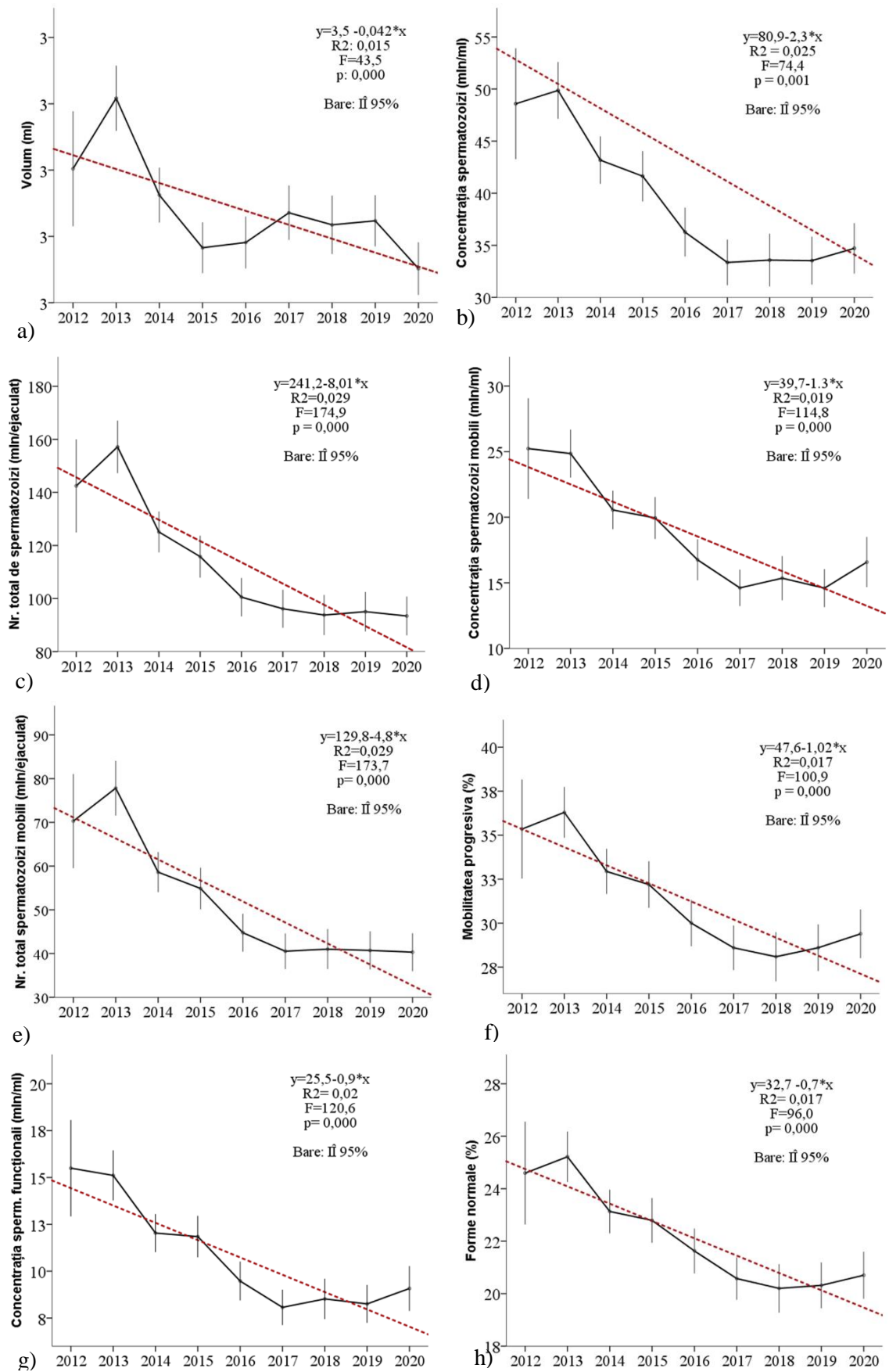


Figura 2. Linia regresiei pentru: a) volum ejaculat; b) concentrația spermatozoizilor; c) nr. total spermatozoizi; d) mobilitatea progresivă; e) concentrația sperm. funcționali; d) forme normale, perioada anilor 2012-2020

Rezultatele evaluării parametrilor materialului seminal (n=5767) demonstrează clar că cantitatea și calitatea materialului seminal scade în perioada de studiu 2012 -2020. Tendințele de scădere au fost semnificative pentru toți parametrii spermei: volumul de material seminal (de la 3,0 ± 1,2 ml până la 2,7 ± 1,0 ml, 1,1% pe an); concentrația spermatozoizilor (48,6 ± 38,1 milioane/ml până la 34,7 ± 29,1 milioane/ml, 3,2% pe an); numărul total de spermatozoizi (142,5 ± 125,9 milioane până la 93,4 ± 88,1 milioane, 3,8% pe an); mobilitatea progresivă (35,3 ± 20,2 % până la 29,4 ± 16,7 %, 1,9% pe an); concentrația de spermatozoizi mobili (25,2 ± 27,5 milioane/ml până la 16,6 ± 23,1 milioane/ml, 3,6% pe an); numărul total de spermatozoizi mobili (70,3 ± 77,1 milioane până la 40,3 ± 52,4 milioane, 4,7% pe an); concentrația spermatozoizilor funcționali (15,5 ± 18,4 milioane/ml până la 9,1 ± 14,4 milioane/ml, 3,9% pe an); numărul total de spermatozoizi funcționali (42,2 ± 52,1 milioane până la 22,5 ± 35,3 milioane, 5,2% pe an); forme normale (24,6 ± 14% până la 20,7 ± 12%, 1,8% pe an) și vitalitate (58 ± 36% până la 30 ± 34%, 3,8% pe an) .

3.3. Estimarea calității și cantității materialului seminal în eșantionul cu normozoospermie

Diagnosticul de normozoospermie se referă la parametrii materialului seminal care îndeplinesc criteriile definite de OMS în spermogramă. În studiul actual, bărbații cu normozoospermie au fost selectați conform valorile de referință ale spermogramei OMS din 2010, fără a include prezența leucocitelor. Din întregul eșantion (n=5767) al spermogramelor analizate, rezultatele cu parametrii spermogramei în limitele normale fiind (n=1685).

Rezultatele evaluării parametrilor materialului seminal la populația masculină cu normozoospermie (n=1685) arată că cantitatea și calitatea materialului seminal scade în perioada de studiu. Tendințele de scădere au fost semnificative pentru toți parametrii spermogramei cu excepția unui singur pentru viabilitate: volumul de material seminal (0,05ml / 1,04% pe an); concentrația spermatozoizilor (1,14 mln/ml / 1,4% pe an); numărul total de spermatozoizi (6,6 mln / 2,4% pe an); mobilitatea progresivă (0,4% / 0,7% pe an); concentrația de spermatozoizi mobili (0,7 mln/m / 1,7 % pe an); numărul total de spermatozoizi mobili (4,6 mln / 3,2% pe an); concentrația spermatozoizilor funcționali (0,6 mln/ml / 2,8% pe an); numărul total de spermatozoizi funcționali (3,4 mln / 4,0% pe an); indexul mobilității (3,1 / 1,4% pe an) și forme normale (0,3% / 0,8% pe an) (Tabelul 1).

Tabelul 1. Regresia liniară simplă a parametrilor spermogramei la bărbații cu normozoospermie anii 2012-2020

Parametrii spermogramei	Constanta	B	R2	F	P
Volum (ml)	3,8	-0,05	0,011	18,2	0,000
pH	7,7	0,01	0,001	2,4	0,122
Concentrația spermatozoizilor (mln/ml)	93,3	-1,14	0,013	22,5	0,000
Nr. total de spermatozoizi (mln/ml)	330,9	-6,61	0,022	38,6	0,000
Mobilitatea progresivă (%)	57,1	-0,41	0,015	25,4	0,000
Concentrația sperm. mobili (mln/ml)	50,7	-0,67	0,006	10,3	0,001
Nr. total de sperm. mobili (mln/ejaculat)	190,6	-4,55	0,023	40,3	0,000
Concentrația sperm. funcționali (mln/ml)	34,5	-0,65	0,009	14,8	0,000
Nr. total de sperm. funcționali (mln/ejaculat)	124,7	-3,41	0,024	40,8	0,000
Indexul mobilității	254,8	-3,13	0,013	22,8	0,000
Forme normale (%)	39,3	-0,31	0,014	23,7	0,000
Viabilitate (%)	89,5	0,52	0,012	20,4	0,000

3.4. Evaluarea rezultatelor spermogramelor, conform OMS 2010

În anii 2012-2020, din numărul total de (n=5767) de spermograme analizate, 29,2% (n=1685) au prezentat valori normale ale materialului seminal - normozoospermie și 70,8% (n=4082) tulburări de spermatogeneză. Pe întreaga perioadă de studiu, au fost semnificate diferențe statistice semnificative $X^2=352,7$; $gl=40$; $p=0,000$. Cea mai frecventă anomalie a spermatogenezei a fost înregistrată astenoospermia în 35% (n=2016), urmată de oligozoospermia în 27,8% (n=1606), azoospermia 3,9% (n=224), oligoastenoospermia 2,5% (n=143) și oligoastenoteratozoospermia 1,6% (n=93), (Tabelul 2)

Tabelul 2. Repartizarea bărbaților conform rezultatelor spermogramei pe perioade agregate

Diagnostic spermograme	Anii						X^2 ; gl ; p
	2012-2015		2016-2020		Total		
	n	%	n	%	n	%	
Normozoospermia	986	38,7	699	21,7	1685	29,2	$X^2=2,2$; $gl=1$; $p=0,136$
Oligozoospermia	587	23,0	1019	31,7	1606	27,8	$X^2=12,1$; $gl=1$; $p=0,001$
Oligoastenoteratozoospermia	39	1,5	54	1,7	93	1,6	$X^2=3,3$; $gl=1$; $p=0,071$
Astenozoospermia	756	29,7	1260	39,2	2016	35,0	$X^2=0,4$; $gl=1$; $p=0,530$
Oligoastenospemia	60	2,4	83	2,6	143	2,5	$X^2=0,1$; $gl=1$; $p=0,795$
Azoospermia	121	4,7	103	3,2	224	3,9	$X^2=3,2$; $gl=1$; $p=0,075$
Total	2549	100	3218	100	5767	100	$X^2=224,1$; $gl=5$; $p=0,000$

În anul 2012, normozoospermia a fost înregistrată în 46,5% (n=93) și în anul 2020, ajunge la 14,5% (n=81). Se observă un declin a valorilor normale ale spermatogenezei, cu o rată anuală medie de descreștere de 7,6%, în anii 2012-2015 fiind de 38,7% (n=986) și în anii 2016-2020 de 21,7% (n=699). Astenozoospermia a fost depistată în anul 2012 în 21,5% și anul 2020 în 47,2%, (creștere cu 13,2% pe an). Oligozoospermia observăm creștere de-a lungul anilor de studiu, de la 21% până la 30,9%, (crește cu 5,2%), inclusiv și oligoastenozoospermia de la 2,4% până la 2,6%, și oligoastenoteratozoospermia de la 1,5 până la 1,6% (Figura 3).

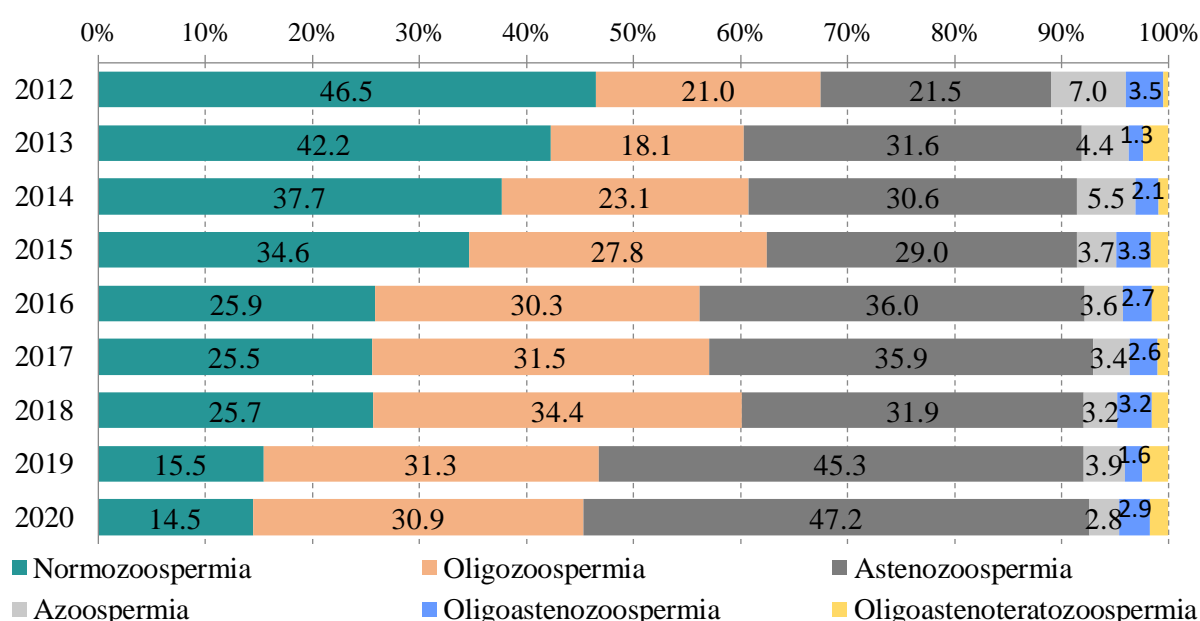


Figura 3. Clasificarea materialului seminal pe criterii diagnostice în perioada anilor 2012-2020

Reprezentarea indicatorilor calitativi și cantitativi a materialului seminal prin regresie la un număr semnificativ de (n=5767) bărbați au descris situația la momentul actual și demonstrează deteriorarea a sănătății reproductive masculine în Republica Moldova. Datele prezentate sunt indicatori substanțiali, ce pot servi ca dovezi argumentate pentru autoritățile de sănătate să ia decizii în cunoștință de cauză, de a se concentra pe programul de management și prevenire a infertilității masculine.

4. ASPECTE FENOTIPICE ȘI GENETICE ALE BĂRBAȚILOR CU AZOOSPERMIE

4.1. Particularitățile fenotipice ale bărbaților azoospermici cu variații ale cariotipului, deleții AZF, mutații CFTR depistate și fără variații genetice depistate

În urma investigațiilor molecular genetice (testarea microdelețiilor cromozomului Y și testarea genei CFTR) și citogenetice (cariotipare prin bandare G), bărbații cu azoospermie investigați (n=96) au fost repartizați în două subloturi: sublotul 1 – (n=35) pacienți confirmați prin testele genetice propuse și sublotul 2 – (n=61) pacienți care nu au fost confirmați prin testele genetice disponibile. Dintre pacienții confirmați genetic 25% au cariotip anormal, 10,4% prezintă microdeleții Y și 3,1% au mutații în gena CFTR (Figura 4).

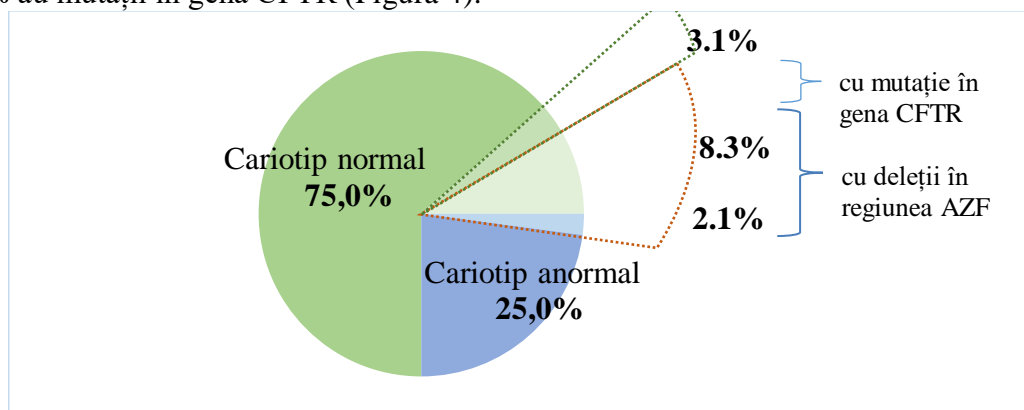


Figura 4. Structura incidenței cauzelor genetice confirmate prin teste molecular-genetice și citogenetice la bărbații cu azoospermie (n=96)

Pacienții din ambele subloturi au fost analizați pe grupe de vârstă. Vârsta medie a bărbaților azoospermici ce se confruntă cu infertilitatea în cuplu în sublotul 1 de studiu (n=35) a fost de 34,1 ±4,3 ani, (Î 95%: 32,6 – 35,6; mediana: 34,0) și în sublotul 2 de 33,6 ±5,8 ani, (Î 95%: 32,1 – 35,1; mediana: 33,0). Media istoriei infertilității la eșantionul de studiu 1 a fost de 6,5 ±3,6 ani, (Î 95%: 5,2 – 7,7; mediana 7,0) și eșantionul 2 de studiu de 6,4 ±5,1 ani, (Î 95%: 5,1 – 7,7; mediana 4,0). În sublotul de studiu 1, media de vârstă la care s-a diagnosticat infertilitatea este de 27,3 ±3,6 ani, (Î 95%: 26,4 – 28,9; mediana 28,0) și în sublotul 2 de referință 27,3 ±3,3 ani, (Î 95%: 26,3 – 28,0; mediana 27,0), (Tabelul 3).

Tabelul 3. Vârsta și istoria infertilității la bărbații cu azoospermie în lotul de cercetare

		Sublot 1 n=35	Sublot 2 n=61	Total n=96
Vârsta (ani)	Media ± DS	34,1 ± 4,3	33,6 ± 5,8	33,8 ± 5,3
	Î 95%	32,6 – 35,6	32,1 – 35,1	32,7 – 34,9
	Mediana	34,0	33,0	33,0
	Percentila 25 – 75	31,0 – 36,0	29,0 – 37,0	30,0 – 36,0
	Minim – Maxim	28,0 – 47,0	19,0 – 52,0	19,0 – 52,0
Istoria infertilității (ani) <i>F= 0,002;</i> <i>P=0,968</i>	Media ± DS	6,5 ± 3,6	6,4 ± 5,1	6,4 ± 4,6
	Î 95%	5,2 – 7,7	5,1 – 7,7	5,5 – 7,4
	Mediana	7,0	4,0	5,0
	Percentila 25 – 75	3,0 – 8,0	2,0 – 10,0	3,0 – 9,0
	Minim – Maxim	1,0 – 14,0	1,0 – 20,0	1,0 – 20,0
Vârsta la diagnoză (ani) <i>F=0,415;</i> <i>p=0,521</i>	Media ± DS	27,7 ± 3,6	27,2 ± 3,3	27,4 ± 3,4
	Î 95%	26,4 – 28,9	26,3 – 28,0	26,7 – 28,1
	Mediana	28,0	27,0	27,0
	Percentila 25 – 75	25,0 – 30,0	25,0 – 30,0	25,0 – 30,0
	Minim – Maxim	21,0 – 35,0	18,0 – 34,0	18,0 – 35,0

Am analizat particularitățile materialului seminal al pacienților în ambele subloturi. Conform cerințelor OMS, efectuarea calitativă a spermogramei, necesită ca pacientul să respecte o perioadă de abținere cu o durată de 3-7 zile înaintea prelevării. Astfel, durata de abținere în sublotul 1 de studiu a constituit 4,5 ±1,3 zile, (Î 95%: 4,1 – 5,0; mediana 5,0), iar în sublotul 2 de referință – 4,9 ±1,4 zile, (Î 95%: 4,6 – 5,3; mediana 5,0), fără diferență statistic semnificativă între loturi (F=1,96;

p=0,164). Spermograma a fost prelevată parțial doar într-un caz din subplotul 1 de studiu și 2 cazuri în subplotul 2, la ceilalți participanți a fost prelevată complet (Tabelul 4).

Tabelul 4. Parametrii spermogramei la bărbații cu azoospermie repartizate pe loturi de cercetare

Parametrii spermogramei		Sublot 1 n=35	Sublot 2 n=61	Total n=96
Abstenența (zile)	Media ± DS	4,5 ± 1,3	4,9 ± 1,4	4,8 ± 1,4
	Î 95%	4,1 – 5,0	4,6 – 5,3	4,5 – 5,0
	Mediana	5,0	5,0	5,0
	Percentila 25 – 75	3,0 – 5,0	4,0 – 6,0	4,0 – 6,0
<i>F=1,96;</i> <i>p = 0,164</i>	Minim – Maxim	2,0 – 7,0	3,0 – 7,0	2,0 – 7,0
	Media ± DS	2,3 ± 0,8	2,9 ± 1,3	2,7 ± 1,2
	Î 95%	2,0 – 2,6	2,5 – 3,2	2,4 – 2,9
	Mediana	2,4	2,9	2,6
<i>F=5,13;</i> <i>p = 0,026</i>	Percentila 25 – 75	1,5 – 2,8	2,0 – 3,5	2,0 – 3,3
	Minim – Maxim	0,3 – 3,8	0,3 – 8,0	0,3 – 8,0
	Media ± DS	37,4 ± 8,0	38,3 ± 10,4	38,0 ± 9,5
	Î 95%	34,7 – 40,2	35,6 – 40,9	36,0 – 39,9
<i>F=0,75;</i> <i>p = 0,676</i>	Mediana	40,0	40,0	40,0
	Percentila 25 – 75	30,0 – 45,0	35,0 – 45,0	32,5 – 45,0
	Minim – Maxim	20,0 – 60,0	10,0 – 60,0	10,0 – 60,0
	Media ± DS	7,5 ± 0,4	7,7 ± 0,5	7,6 ± 0,5
pH	Î 95%	7,3 – 7,6	7,6 – 7,8	7,5 – 7,7
	Mediana	7,5	7,8	7,7
	Percentila 25 – 75	7,1 – 7,8	7,6 – 8,0	7,4 – 7,9
	Minim – Maxim	6,7 – 8,2	5,5 – 9,0	5,5 – 9,0
Leucocite (mln/ml)	Media ± DS	0,7 ± 0,9	0,8 ± 0,9	0,8 ± 0,9
	Î 95%	0,4 – 1,0	0,6 – 1,1	0,6 – 1,0
	Mediana	0,6	0,7	0,6
	Percentila 25 – 75	0,1 – 1,0	0,1 – 1,0	0,1 – 1,0
<i>F=0,26;</i> <i>p = 0,606</i>	Minim – Maxim	0 – 5,0	0 – 4,9	0 – 5,0

Timpul de lichefiere a materialului seminal nu a diferențiat esențial între subploturi, fiind în subplotul 1 de studiu – 37,4 ± 8,0 min, (Î 95%: 34,7 – 40,2; mediana 40) și în subplotul 2 de referință – 38,3 ± 10,4 min, (Î 95%: 35,6 – 40,9; mediana 40), respectiv nu se observă diferențe statistice semnificative între subploturi ($F=0,75$; $p=0,676$) (Tabelul 4).

Volumul spermogramei la pacienții din subplotul de studiu 1 s-a dovedit a fi statistic semnificativ mai mic, decât la cei din subplotul 2 de referință ($F=5,13$; $p=0,026$). Astfel, în subplotul 1 de studiu volumul a fost de 2,3 ± 0,8 ml, (Î 95%: 2,0 – 2,6; mediana 2,4), pe când în subplotul 2 de studiu – 2,9 ± 1,3 ml, (Î 95%: 2,5 – 3,2; mediana 2,9) (Tabelul 4, Figura 5).

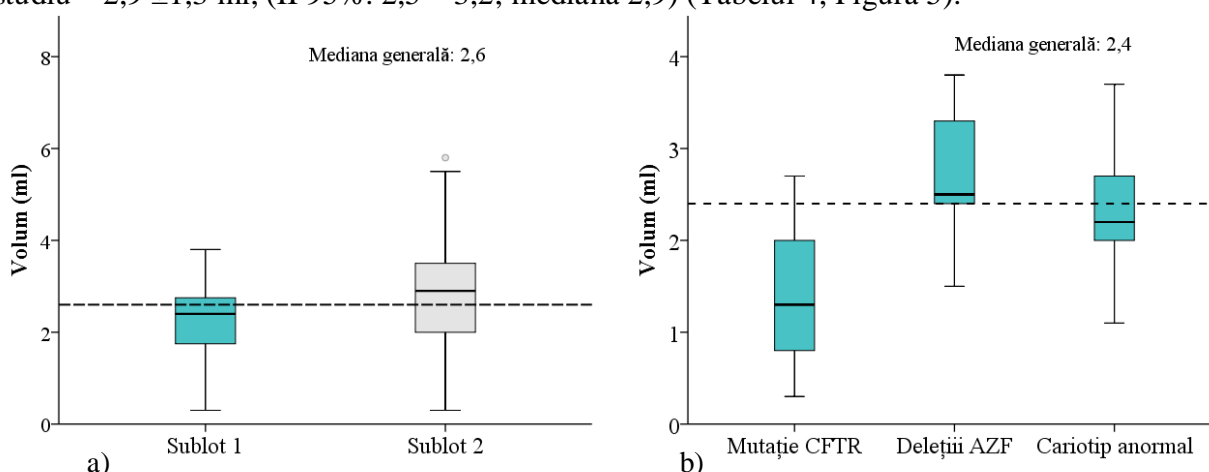


Figura 5. Analiza box plot a datelor volumului (ml) repartizat pe subplotul 1 de studiu (a, b) și subplotul 2 de studiu (a)

Valoarea pH a spermei în ambele subploturi este bazică (alcalină), având valoarea 7,5 ± 0,4, (Î 95%: 7,3 – 7,6; mediana 7,5) în subplotul 1 de studiu și 7,7 ± 0,5, (Î 95%: 7,6 – 7,8; mediana 7,8) în subplotul 2 de studiu, prezentând diferență statistic semnificativă între subploturi ($F=6,29$; $p=0,014$) (Tabelul 4, Figura 6).

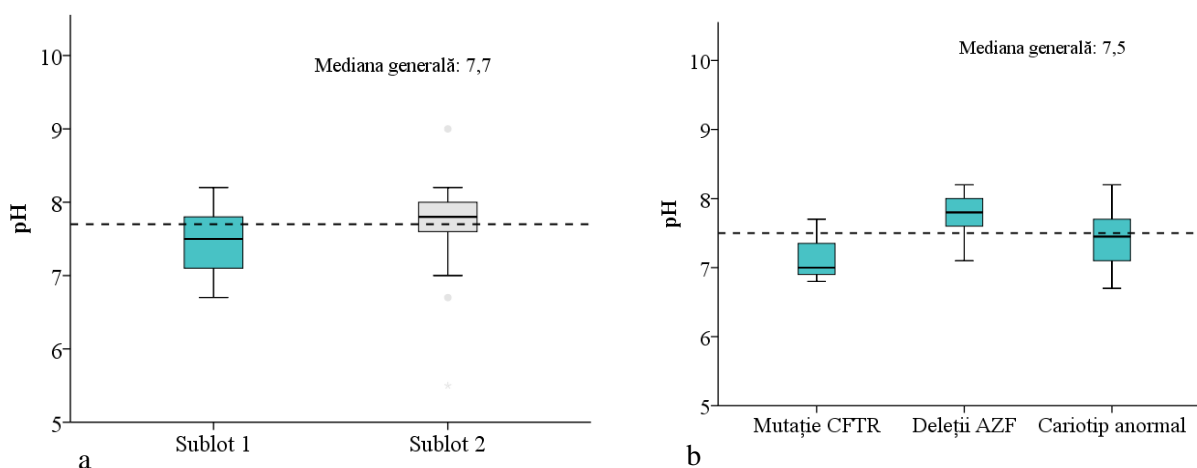


Figura 6. Analiza box plot a valorilor pH repartizat pe subplotul 1 (a, b) și subplotul 2 de studiu (a)

Pentru a identifica factori posibili ce ar fi putut afecta statutul fertilității, au fost analizate datele din anamneza pacienților. S-a constatat că, aproximativ, 2/3 dintre participanții la cercetare nu au suportat în copilărie boli, care presupun afectarea fertilității: în subplotul 1 de studiu – 22 (62,9%) pacienți și în subplotul 2 de studiu – 39 (63,9%) pacienți, fără diferență statistic semnificativă între loturi ($\chi^2=0,11$; $gl=1$; $p=0,916$). Oreion în subplotul 1 de studiu au prezentat în 61,5% ($n=8$) și subplotul 2 de 50,0 ($n=11$). Orhita virală au prezentat în 22,7% ($n=5$) în subplotul 1 și 15,4% ($n=2$) subplotul 2.

Unii bărbați investigați au menționat prezența traumatismelor genitale în anamneză, care, la fel, ar putea influența fertilitatea: în subplotul 1 de studiu 11,4% ($n=4$) și în subplotul 2 de referință 31,7% ($n=19$), fără diferență statistic semnificativă între loturi ($\chi^2=4,96$; $gl=1$; $p=0,026$) (Tabelul 5). Intervenții chirurgicale în regiunea pelviană menționează în 14,3% ($n=5$) din participanți din subplotul 1 de studiu și 21,3% ($n=13$) din subplotul 2 ce nu determină diferență statistic semnificativă între ele ($\chi^2=0,721$; $gl=1$; $p=0,396$). Infecțiile genitale precum epididimita sau uretrita au fost prezente la 17,1% ($n=6$) din participanți din subplotul 1 de studiu și 24,6% ($n=15$) din subplotul 2 de studiu fără diferență statistic semnificativă între acestea ($\chi^2=0,722$; $gl=1$; $p=0,396$). Expuneri la gonadotoxice, cum ar fi radioterapia, chimioterapia, febră recentă sau medicamente curente, au avut 25,7% ($n=9$) din pacienți din subplotul 1 de studiu și 32,8% ($n=20$) din subplotul 2 de referință, diferență statistic semnificativă între subploturi nu se atestă ($\chi^2=0,528$; $gl=1$; $p=0,468$). Suferă de tabagism, aproximativ, aceeași proporție de participanți din ambele subploturi: în subplotul 1 de studiu – 42,9% ($n=15$) de pacienți și în subplotul 2 de studiu – 37,7% ($n=23$) fără diferență statistic semnificativă între ele ($\chi^2=0,247$; $gl=1$; $p=0,619$). Luând în considerare influența unui posibil istoric familial de anomalii congenitale, retard mental, tulburări de reproducere sau fibroza chistică asupra fertilității, participanții au fost interogați și la acest capitol. Au fost primite următoarele răspunsuri afirmative: în subplotul 1 de studiu în 25,7% ($n=9$) cazuri și în subplotul 2 de studiu – 14,8% ($n=9$) cazuri (Tabelul 5).

Tabelul 5. Asocierea unor factori de risc ce pot afecta fertilitatea în loturile cercetate

Factori de risc din istoricul personal		Sublot 1		Sublot 2		Total	
		n = 35	%	n = 61	%	n = 96	%
Traumatisme genitale	nu	31	88,6	41	68,3	72	75,8
	da	4	11,4	19	31,7	23	24,2
Intervenții chirurgicale în regiunea pelviană	nu	30	85,7	48	78,7	78	81,3
	da	5	14,3	13	21,3	18	18,8
Infecții genitale	nu	29	82,9	46	75,4	75	78,1
	da	6	17,1	15	24,6	21	21,9
Expuneri la gonadotoxice	nu	26	74,3	41	67,2	67	69,8
	da	9	25,7	20	32,8	29	30,2
Este consumator de țigări	nu	20	57,1	38	62,3	58	60,4
	da	15	42,9	23	37,7	38	39,6
Istoric familial anomalii congenitale	nu	26	74,3	52	85,2	78	81,3
	da	9	25,7	9	14,8	18	18,8

Analiza manifestărilor clinice din sfera urogenitală a pacienților a permis identificarea unor semne clinice sugestive pentru anumite entități nozologice. Deși în ambele subloturi câte jumătate de participanți au avut dimensiunea și consistența testiculelor normală, totuși, prezența modificărilor a determinat diferență statistic semnificativă între subloturi ($\chi^2=12,1$; $gl=3$; $p=0,007$). Testiculele micșorate în volum s-au înregistrat în 8,6% ($n=3$) din pacienți din sublotul 1 de studiu și 29,5% ($n=18$) din sublotul 2 de studiu (Tabelul 6).

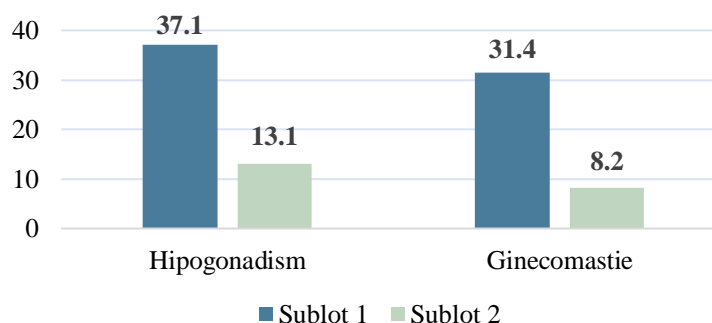


Figura 7. Pondere hipogonadismului și ginecomastiei la ambele subloturi de cercetare

Prezența hipogonadismului fiind mai frecvent în 37,1% ($n=13$) la sublotul 1 de studiu comparativ cu sublotul 2 de referință 13,1% ($n=8$). Dintre pacienții cu patologii genetice cel mai frecvent hipogonadismul s-a înregistrat la pacienții cu cariotip anormal în 50,0% ($n=11$), urmată la pacienții cu deleții în regiunea AZF 20,0% ($n=2$) (Tabelul 6, Figura 7).

Prezența ginecomastiei este statistic semnificativ mai frecventă în sublotul 1 de studiu de 31,4% ($n=11$) și în sublotul 2 de 8,2% ($n=5$), ($\chi^2=8,642$; $gl=1$; $p=0,003$) (Figura 7). În sublotul 1 de studiu ginecomastia este mai frecventă la pacienții cu cariotip anormal în 45,5% ($n=10$), urmată de 10,0% ($n=1$) la pacienții cu microdeleții ale cromozomului Y, la pacienții cu mutații în gena CFTR nu s-a înregistrat ($\chi^2=5,5$; $gl=2$; $p=0,063$) (Tabelul 6).

Tabelul 6. Repartizarea manifestărilor clinice în lotul de cercetare

Manifestările clinice		Sublot 1		Sublot 2		Total	
		n = 35	%	n = 61	%	n = 96	%
Dimensiunea și consistența testiculelor	normală	19	54,3	32	52,5	51	53,1
	micșorate în volum	3	8,6	18	29,5	21	21,9
	hipogonadism	13	37,1	8	13,1	21	21,9
	lipsa unui /chist testicular			3	4,9	3	3,1
$\chi^2=12,1$; $gl=3$; $p=0,007$							
Habitusul corporal	normostenică	15	42,9	37	60,7	52	54,2
	hiperstenică	15	42,9	18	29,5	33	34,4
	astenică	5	14,3	6	9,8	11	11,5
$\chi^2=2,838$; $gl=2$; $p=0,242$							
Ginecomastie	lipsa	24	68,6	56	91,8	80	83,3
	prezența	11	31,4	5	8,2	16	16,7
$\chi^2=8,642$; $gl=1$; $p=0,003$							
Canalul deferent	se palpează	32	91,4	59	96,7	91	94,8
	nu se palpează	3	8,6	2	3,3	5	5,2
$\chi^2=1,26$; $gl=1$; $p=0,261$							
Varicocele	lipsa	33	94,3	54	88,5	87	90,6
	prezența	2	5,7	7	11,5	9	9,4
$\chi^2=0,86$; $gl=1$; $p=0,351$							
Examenul clinic al prostatei	fără modificări	24	68,6	42	68,9	66	68,8
	prezintă modificări	11	31,4	19	31,1	30	31,3
$\chi^2=0,001$; $gl=1$; $p=0,977$							

Deși în sublotul 2 în 60,7% comparativ cu sublotul 1 de 42,9% predomină constituția normostenică, habitusul corporal nu diferă statistic semnificativ între subloturi ($\chi^2=2,838$; $gl=2$; $p=0,242$). Constituția hiperstenică este mai frecventă în sublotul 1 de studiu 42,9% ($n=15$); în cazul pacienților cu mutații în gena CFTR 66,7% ($n=2$), cu cariotip anormal 54,7% ($n=12$) și deleții în regiunea AZF 10% ($n=1$). Prezența congenitală bilaterală a canalului deferent se palpează la majoritatea pacienților din ambele subloturi de cercetare: în sublotul 1 de studiu la 91,4% ($n=32$) pacienți și în sublotul 2 la 96,7% ($n=59$) pacienți, ($\chi^2=1,262$; $gl=1$; $p=0,261$). În schimb, dacă analizăm la pacienții cu patologii genetice canalul deferent se palpează la toți pacienții cu cariotip anormal și deleții în regiunea AZF și nu se palpează la toți pacienții cu mutații în gena CFTR, ($\chi^2=35,0$; $gl=2$; $p=0,000$). Din numărul total dintre participanții fiecărui sublot de studiu, examenul clinic al prostatei nu prezintă modificări: în sublotul 1 de studiu – 68,6% ($n=24$) cazuri și în sublotul

2 de studiu– 68,9% (n=42) cazuri, fără atestarea unei diferențe statistic semnificative între subploturi ($\chi^2=0,001$; $g=1$; $p=0,977$).

Valorile markerelor endocrini (FSH, LH, prolactina și testosteron) ai fertilității au fost determinate și analizate la pacienții cu azoospermie. Valoarea medie a nivelului hormonului FSH în subplotul 1 de studiu a constituit $9,9 \pm 9,1$ mIU/ml, (Î 95%: 6,8-13,0; mediana 7,3) cu valoarea minimă de 1,1 mIU/ml și valoarea maximă de 38,4 mIU/ml, iar în subplotul 2 nivelul valorii medii a fost $8,1 \pm 7,8$ mIU/ml, (Î 95%: 6,1-10,0; mediana 4,7) cu valoare minimă de 0,9 mIU/ml și valoarea maximă de 40,7 mIU/ml. Diferență statistic semnificativă între subploturi nu se atestă ($F=1,16$; $p=0,283$). Nivelul hormonului LH a înregistrat valoare medie de $10,1 \pm 8,1$ mIU/ml, (Î 95%: 7,3-12,8; mediana 7,5) în subplotul 1 de studiu cu valoarea minimă de 1,1 mIU/ml și valoarea maximă de 28,6 mIU/ml, iar în subplotul 2 de $-7,6 \pm 5,6$ mIU/ml, (Î 95%: 6,1-9,2; mediana 6) cu valoare minimă de 1,0 mIU/ml și valoarea maximă de 27,7 mIU/ml, ($F=2,74$; $p=0,101$), (Tabelul 7).

Tabelul 7. Caracteristicile markerelor endocrini în loturile de cercetare

Markerii endocrini		Sublot 1 n=35	Sublot 2 n=61	Total n=96
FSH 2,0 – 10,0 mIU/ml <i>F=1,16;</i> <i>p = 0,283</i>	Media \pm DS	9,9 \pm 9,1	8,0 \pm 7,8	8,7 \pm 8,3
	Î 95%	6,8 – 13,0	6,0 – 10,0	7,0 – 10,4
	Mediana	7,3	4,7	5,2
	Percentila 25 – 75	2,5 – 15,1	3,0 – 10,5	3,0 – 11,6
	Minim – Maxim	1,1 – 38,4	0,9 – 40,7	0,9 – 40,7
LH 3,0 – 12,0 mIU/ml <i>F=2,74;</i> <i>p = 0,101</i>	Media \pm DS	10,1 \pm 8,1	7,6 \pm 5,6	8,6 \pm 6,7
	Î 95%	7,3 – 12,8	6,1 – 9,2	7,2 – 10,0
	Mediana	7,5	6,0	6,4
	Percentila 25 – 75	3,5 – 13,8	4,0 – 9,8	4,0 – 11,2
	Minim – Maxim	1,1 – 28,6	1,0 – 27,7	1,0 – 28,6
Prolactina 1,8 – 17,0 ng/ml <i>F=4,423;</i> <i>p = 0,038</i>	Media \pm DS	14,6 \pm 6,3	19,5 \pm 12,4	17,5 \pm 10,6
	Î 95%	12,4 – 16,8	16,0 – 23,0	15,3 – 19,8
	Mediana	12,9	16,0	15,9
	Percentila 25 – 75	11,0 – 19,5	11,4 – 20,5	11,3 – 19,7
	Minim – Maxim	4,3 – 31,0	5,6 – 65,0	4,3 – 65,0
Testosteron 2,0 – 6,9 ng/ml <i>F=6,386;</i> <i>p = 0,013</i>	Media \pm DS	3,5 \pm 1,2	2,9 \pm 1,3	3,1 \pm 1,3
	Î 95%	3,1 – 4,0	2,5 – 3,2	2,9 – 3,4
	Mediana	3,2	3,0	3,0
	Percentila 25 – 75	2,7 – 4,6	2,0 – 3,5	2,4 – 3,7
	Minim – Maxim	1,2 – 5,6	0,7 – 6,2	0,7 – 6,2
Testosteron liber <i>F=0,21;</i> <i>p = 0,644</i>	Media \pm DS	11,7 \pm 9,2	13,3 \pm 8,4	12,7 \pm 8,6
	Î 95%	5,1 – 18,3	8,9 – 17,8	9,2 – 16,1
	Mediana	8,4	13,8	13,5
	Percentila 25 – 75	2,8 – 18,5	7,0 – 16,4	4,1 – 17,5
	Minim – Maxim	2,8 – 28,8	1,7 – 35,5	1,7 – 35,5

Nivelul prolactinei a avut în subplotul 1 de studiu valoarea medie de $14,6 \pm 6,3$ ng/ml, (Î 95%: 13,1-17,4; mediana 12,9) cu cel mai mic nivel de 4,3 ng/ml și cel mai mare de 31,0 ng/ml, iar în subplotul 2 de referință– $19,5 \pm 12,4$ ng/ml, (Î 95%: 16,0-23,0; mediana 16,0) cu cel mai mic nivel de 5,6 ng/ml și cel mai mare de 65,0 ng/ml. Diferența dintre loturi este statistic semnificativă ($F=4,423$; $p=0,038$). De asemenea, se observă o diferență statistic semnificativă între loturi al valorilor medii ale nivelului de testosteron ($F=6,386$; $p=0,013$). Astfel, în subplotul 1 de studiu valoarea medie a nivelului de testosteron este egală cu $3,5 \pm 1,2$ ng/ml, (Î 95%: 3,1-3,9; mediana 3,2), oscilând între 1,2 ng/ml și 5,6 ng/ml, iar în subplotul 2 de studiu – $2,9 \pm 1,3$ ng/ml; (Î 95%: 2,4-3,3), oscilând între 0,7 ng/ml și 6,2 ng/ml (Tabelul 7).

Dintre pacienții cu patologii genetice, cea mai mare medie $12,2 \pm 10,5$ mIU/ml, (Î 95%: 7,6 – 16,9; mediana 10,0) a nivelului FSH a fost la pacienții cu cariotip anormal, urmată la pacienții cu deleții în regiunea AZF $6,4 \pm 3,5$ mIU/ml, (Î 95%: 3,9 – 8,9; mediana 6,3) și media $4,7 \pm 4,6$ mIU/ml, (Î 95%: 0 – 16,1; mediana 2,0), cea mai joasă s-a înregistrat la pacienții cu mutații în gena CFTR. Media cea mai înaltă LH, la fel, $12,8 \pm 8,9$ mIU/ml, (Î 95%: 8,9 – 16,8; mediana 10,8) este înscrisă la pacienții cu cariotip anormal, urmata de cei cu deleții AZF $6,2 \pm 3,2$ mIU/ml, (Î 95%: 3,9 – 8,5; mediana 7,1) și cu mutații CFTR $2,6 \pm 1,4$ mIU/ml, (Î 95%: 0 – 6,1; mediana 3,0) (Figura 8).

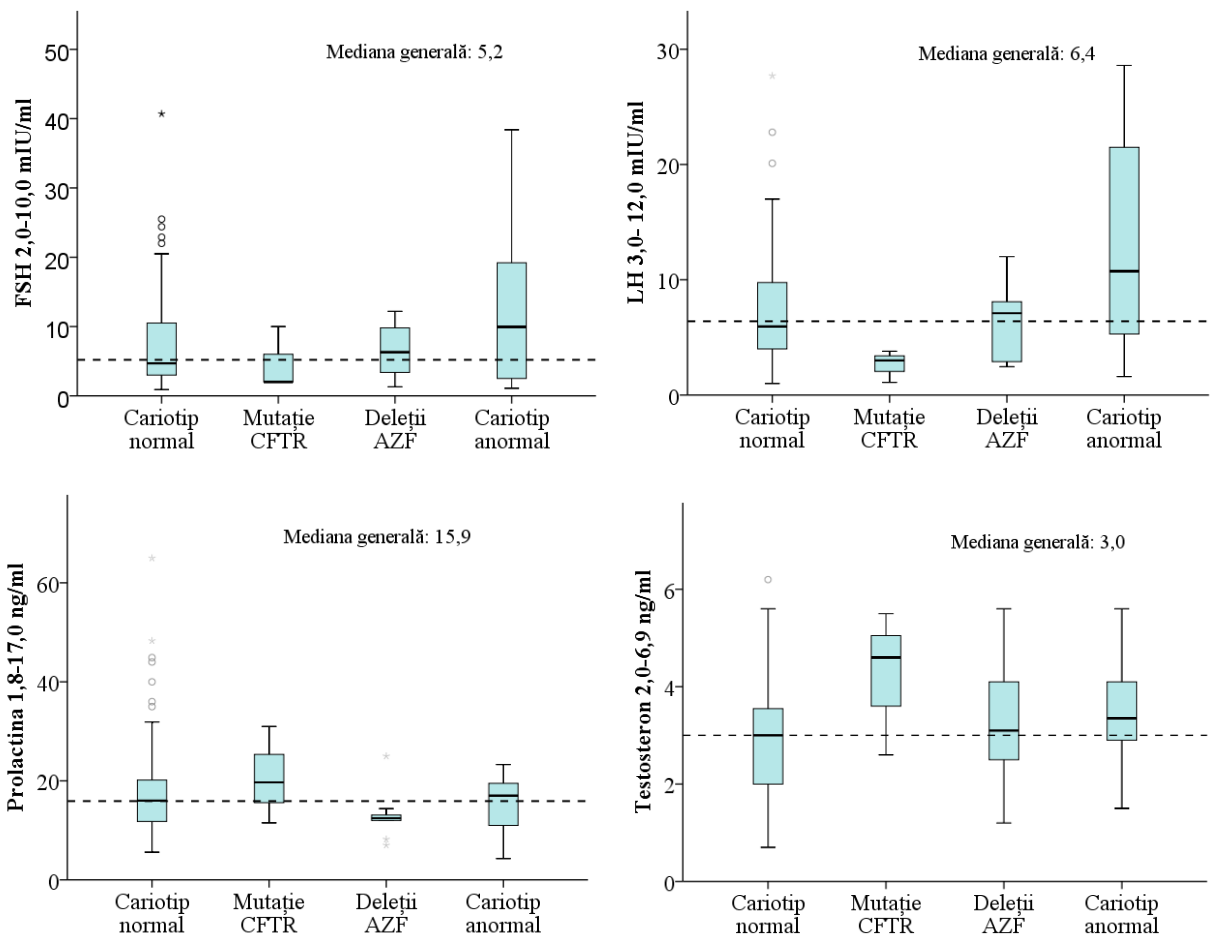


Figura 8. Valorile medii și medianele pentru markerii endocrini la pacienții azoospermici cu cariotip normal și variații genice și cromozomiale

4.2. Variații cromozomiale la bărbații cu azoospermie diagnosticați prin examenul citogenetic

La toți bărbații din studiu (n=96) s-a analizat cariotipul prin examenul celulelor sângelui periferic, utilizându-se tehnica de bandare G a cromozomilor. Conform examenului citogenetic, din numărul total de (n=96) bărbați infertili cu azoospermie 75% (n=72) au prezentat cariotip normal 46,XY și 25% (ÎÎ 95%: 24,1 – 25,9), (n=24) au prezentat variații de număr sau structură a cromozomilor. De menționat faptul, că rezultatele obținute sunt comparabile cu alte studii de specialitate din Bulgaria 20,7% (19,3 – 22,1), România 30,0% (ÎÎ 95%: 29,1 – 30,9), Turcia 19,2% (18,2 – 20,2), Ucraina 35,0% (ÎÎ 95%: 32,7 – 37,3) etc. (Figura 9).

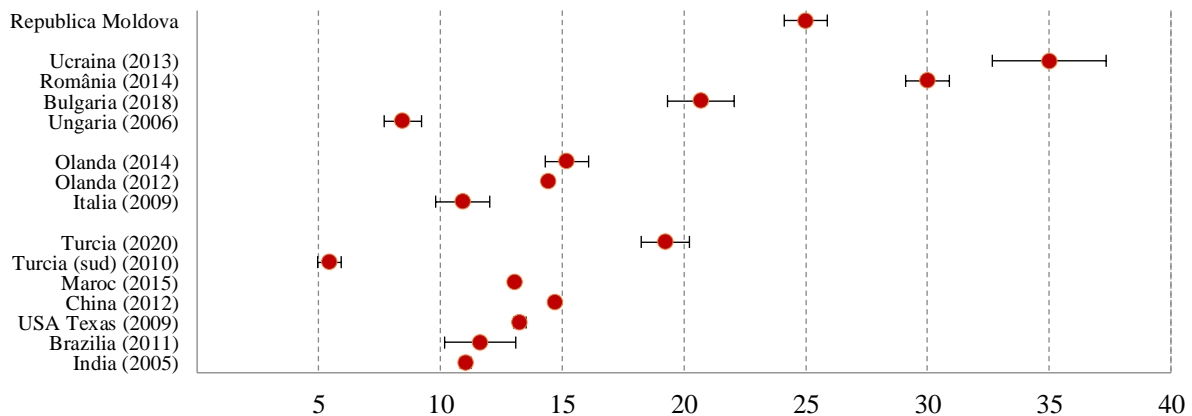


Figura 9. Forest plot pentru prevalența anomaliilor cromozomiale la pacienții azoospermici cercetați comparativ cu alte studii similare

Clasificarea anomaliilor cromozomiale și repartizarea acestora pe grupe de vârstă nu a determinat diferențe statistice semnificative $\chi^2=11,7$; $gl=8$; $p=0,161$. Pacienții cu anomalii cromozomiale numerice au fost diagnosticați în 66,7% la vârsta ≥ 40 ani și 57,9% ($n=11$) la vârsta de 30 -39 ani. Anomalii structurale s-au identificat în 100,0% ($n=2$) la vârsta de 19 -29 ani, în 33,3% ($n=1$) la vârsta ≥ 40 ani și 21,1% ($n=4$) la 30 - 39 ani (Tabelul 8).

Tabelul 8. Frecvența variațiilor cromozomiale la bărbații cu azoospermie pe grupe de vârstă

Rezultate citogenetice	Vârsta ani						Total	
	19 - 29		30 - 39		≥ 40		n=96	%
	n=22	%	n=64	%	n=10	%		
Sindromul Klinefelter/XXY			10	15,6	1	10,0	11	11,5
Sindromul Jacobs/YYY			1	1,6			1	1,04
45,X/46,XY					1	10,0	1	1,04
Translocații robertsoniene			1	1,7			1	1,04
Translocații reciproce	1	4,5	1	1,6			2	2,1
Inversii	1	4,5	1	1,6			2	2,1
46,XX+SR Y					1	10,0	1	1,04
46,Xdel(Y)(q11.21)			1	1,6			1	1,04
Polimorfisme crs.			3	4,7			3	3,13
Situs Fragil			1	1,6			1	1,04
46,XY	20	90,9	45	70,3	7	70,0	72	75,0

Tabelul 9. Clasificarea variațiilor citogenetice la bărbații cu azoospermie corelate cu vârsta

Rezultatele testelor citogenetice	Vârsta ani						Total	
	19 - 29		30 - 39		≥ 40		n=96	%
	n =22	%	n=64	%	n=10	%		
Gonozomale, inclusiv:			13	68,4	3	100	16	66,7
Tipul crs. implicat SK/ XXY			10	76,9	1	33,3	11	68,7
47,YYY			1	7,7			1	4,2
46,XX +SRY					1	33,3	1	4,2
45,X/46,XY					1	33,3	1	4,2
46,Xdel(Y)(q11.21)			1	7,7			1	4,2
46,XYqh+			1	7,7			1	4,2
Autozomale, inclusiv:	2	100	6	31,6			8	33,3
45,XY,rob(13/14)			1	16,7			1	4,2
46,XY, t(1;19)(23.2q;q12.4)			1	16,7			1	4,2
46,XY,15ps+			1	16,7			1	4,2
46,XY,22sts			1	16,7			1	4,2
46,XY,der(5),t(9;5)	1	50,0					1	4,2
46,XY, fra(17)(p12)			1	16,7			1	4,2
46,XY,inv(9)(p11q12)	1	50,0					1	4,2
46,XY,inv(9)(p13.21)			1	16,7			1	4,2

Este cunoscut faptul, că anomaliile cromozomilor sexuali sunt cele mai frecvente cauze de infertilitate asociate de cromozomi [8]. În cercetarea noastră, dintre numărul total ($n=96$) de pacienți cu azoospermie, prevalența anomaliilor cromozomilor sexuali s-a identificat în 16,7% ($n=16$) cazuri și 8,3% ($n=8$) cazuri au prezentat anomalii autozomale (Figura 10).

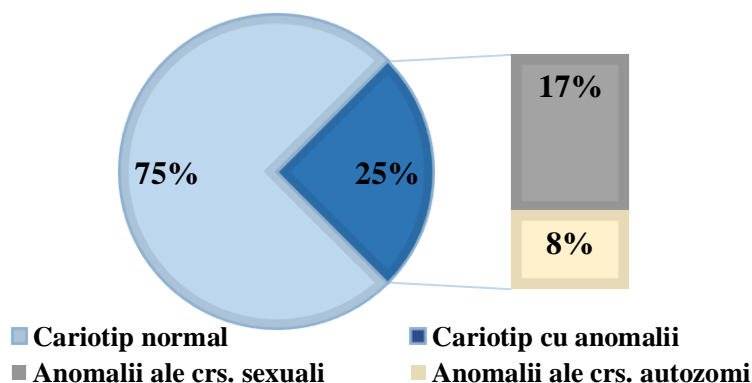


Figura 10. Ponderele anomaliilor cromozomiale la bărbații cu azoospermie ($n=96$)

Tabelul 10. Caracteristica anomaliilor gonozomale în raport cu cele autozomale la pacienții cu azoospermie

Parametrii	An. crs. gonozomale	An. crs. autozomale	Total	p
Nr. pacienților	n=16	n=8	n=24	
Vârsta (ani)	36,2 ±4,9 35,5 (32,5-39,0)	32,0 ±2,9 32,0 (29,5-34,5)	34,8 ±4,8 34,5 (31,0-36,0)	p=0,037
Volum (ml)	2,2 ±0,7 2,2 (1,5-2,5)	2,4 ±0,8 2,4 (2,0-2,9)	2,2 ±0,7 2,2 (1,8-2,6)	p=0,447
FSH (mIU/ml)	15,4 ±10,3 15,5 (7,5-20,6)	4,9 ±4,8 2,9 (1,8-6,7)	11,9 ±10,1 9,2 (2,9-19,1)	p=0,012
LH (mIU/ml)	15,3 ±8,9 13,0 (8,1-23,3)	6,7 ±4,0 5,8 (3,9-9,2)	12,4 ±8,6 9,9 (5,9-19,5)	p=0,018
Prolactina (ng/ml)	12,9 ±6,5 11,3 (7,0-19,1)	15,9 ±5,6 18,0 (11,3-19,6)	13,9 ±6,2 11,8 (7,9-19,5)	p=0,294
Testosteron (ng/ml)	3,4 ±0,9 3,4 (2,9-3,8)	3,9 ±1,2 3,7 (2,8-4,9)	3,6 ±1,0 3,4 (2,9-4,1)	p=0,281
Testosteron liber (ng/ml)	7,1 ±6,8 2,8 (2,8-8,4)	15,9 ±10,5 15,9 (8,4-23,3)	9,6 ±8,3 8,4 (2,8-18,5)	p=0,231

Notă: Media ±DS; Mediana (IIQ)

Vârsta medie a pacienților cu anomalii cromozomiale gonozomale (n=16) a fost de 36,2 ±4,9 ani, (IQ: 32,5 – 39,0; mediana: 35,5) și la pacienții cu anomalii cromozomiale autozomale (n=8) de 32,0 ±2,9 ani, (IQ: 29,5 – 34,5; mediana: 32,0, (F=4,917; p=0,037). Pentru volumul materialului seminal nu s-au constatat diferențe statistice semnificative (F=0,601; p=0,447). În schimb, pentru hormonul FSH se observă diferențe statistice semnificative (F=7,406; p=0,012) între grupele descrise. Media FSH fiind de 15,4 ±10,3, (IQ: 7,5 – 20,6; mediana: 15,5) la subiecții ce au prezentat anomalii cromozomiale sexuale și de 4,9 ±4,8, (IQ: 1,8 – 6,7; mediana: 2,9) la anomaliile autozomale. La fel, pentru hormonul LH se constată diferențe statistice (F=6,576; p=0,018), la pacienții cu anomalii cromozomiale gonozomale cu media de 15,3 ±8,9, (IQ: 8,1 – 23,3; mediana: 13,0) și autozomale de 6,7 ±4,0, (IQ: 3,9 – 9,2; mediana: 5,8). Media pentru hormonul prolactina la subiecții cu anomalii gonozomale este de 12,9 ±6,5, (IQ: 7,0 – 19,1; mediana: 11,3) și la cei cu autozomale de 15,9 ±5,6, (IQ: 11,3 – 19,6; mediana: 18,0), (F=1,158; p=0,294). Testosteronul s-a înregistrat cu media de 3,4 ±0,9, (IQ: 2,9 – 3,8; mediana: 3,4) la subiecții cu anomalii cromozomiale gonozomale și media de 3,9 ±1,2, (IQ: 2,8 – 4,9; mediana: 3,7) autozomale, (F=1,224; p=0,281) (Tabelul 10).

4.2.1 Sindromul Klinefelter (SK) 47,XXY

Din lotul total (n=96) al bărbaților azoospermici investigați citogenetic, 11 au prezentat disomia X, ce reprezintă 11,5% (Tabelul 9). Rezultatele cercetării sunt comparabile cu datele bibliografice, care raportează aceeași frecvență înaltă a Sindromului Klinefelter printre bărbații azoospermici de 10-15%. Vârsta medie a pacienților cu SK a fost de 35,5 ±4,9 ani (ÎI 95%: 32,3–38,8; mediana: 35,0) cu valoarea minimă 30 ani și maximă 47 ani. Media infertilității acestora a fost de 6,3 ±3,1 ani (ÎI 95%: 4,2– 8,3; mediana: 6,0) cu valoarea minimă 3 ani și maximă 14 ani. Fenotipul pacienților cu SK este extrem de heterogen, fiind influențat de tipul cariotipului, cât și de vârsta pacientului. În perioada copilăriei, SK frecvent rămâne nedagnosticat din cauza tabloului clinic nesugestiv. În cercetarea actuală, boli în copilărie au prezentat în 63,6% (n=7), dintre care criptorhidie, orhită virală și oreion, cu toate acestea, nu a fost diagnosticat nici un pacient în această perioadă. Manifestările clinice se conturează în perioada adultă când apare ginecomastia, hipogonadismul și respectiv infertilitatea. Toți pacienții, în cercetarea actuală, au fost diagnosticați în perioada adultă datorită infertilității [9]. În cercetarea actuală, ginecomastia este prezentă în 90,9% (n=10), hipogonadismul în 81,8% (n=9), constituția hiperstenică în 72,7% (n=8) (Figura 11).

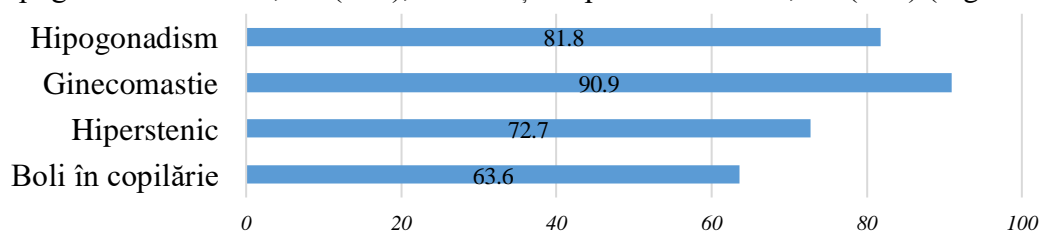


Figura 11. Prevalența manifestărilor clinice la pacienții cu Sindromul Klinefelter

Conform rezultatelor citogenetice, cea mai frecventă variantă cromozomială diagnosticată la cei 11 pacienți infertili cu SK a fost forma omogenă a trisomiei 47,XXY (10 cazuri – 90,9%), urmată de forma mozaică aceleași forme clasice 47,XXY/46,XY (1 caz – 9,1%) (Figura 12, Figura 13).

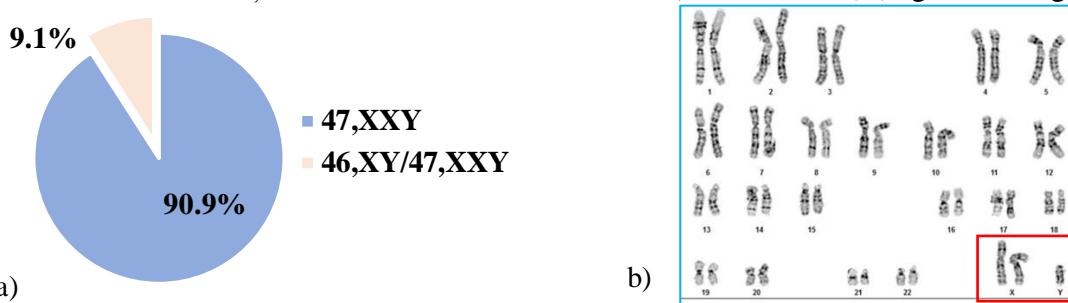


Figura 12. a) Structura variantelor citogenetice diagnosticate la pacienții cu Sindromul Klinefelter; b) Cariotip 47,XXY la pacientul nr. 1, vârsta 31 ani



Figura 13. Cariotip 46,XY/47,XXY la pacientul nr. 25, vârsta 31 ani

Variantele citogenetice diagnosticate în cercetarea actuală vin în confirmarea datelor din literatură, care relatează aceeași incidență înaltă de 80-90% pentru forma clasică 47,XXY a SK și în, aproximativ, 20% se descriu formele mozaice. Aneuploidia 47,XXY este cea mai frecventă anomalie cromozomială, având o incidență care variază de la 1/500 până la 1/1.000, variantele citogenetice ce includ polisomiile X se întâlnesc rar: 48,XXXXY (1/50.000); 49,XXXXXY (1/85.000) [10].

4.2.2 Sindromul Jacobs 47,XYY

Din lotul total (n=96) al bărbaților azoospermici investigați citogenetic un caz a fost diagnosticat cu disomia Y cu o frecvență de 1,04% (Tabelul 8). Conform examenului citogenetic, prezența cromozomului Y suplimentar s-a identificat în toate celulele analizate, cu formula cariotipului 47,XYY (Figura 14). Sindromul 47,XYY este relativ frecvent, observat la 1 din 1000 de nou născuți de sex masculin, fiind a doua cea mai frecventă anomalie a cromozomilor sexuali după sindromul Klinefelter. Cu toate acestea, până la 85% dintre bărbații XYY nu sunt diagnosticați. Diagnosticul acestor pacienți este, de obicei, tardiv, vârsta medie de depistare a maladii fiind 17,1 ani, conform unui studiu danez de cohortă. Aceasta se datorează fenotipului aparent normal în majoritatea cazurilor [11]. Conform datelor bibliografice, majoritatea celor cu cariotipul 47,XYY prezintă spermatogeneză normală, în timp ce, minoritatea pot avea diferite grade de afectare a spermatogenezei de la normală până la azoospermie [12]. Cromozomul Y suplimentar este eliminat în primele etape ale spermatogenezei, prin urmare, la acești pacienți ar putea fi argumentată necesitatea diagnosticului genetic preimplantator (PGD) înainte de tratamentul pentru reproducerea asistată [13].

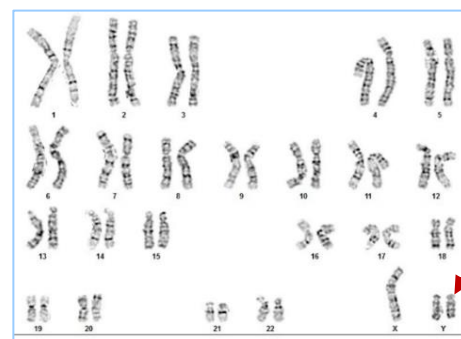


Figura 14. Cariotip 47,XYY, vârsta 35 ani

4.2.3 Sindromul de la Chapelle cu inversie de sex, bărbat 46,XX

La un bărbat azoospermic din numărul total (n=96) a fost identificat cariotipul 46,XX (1,04%) (Tabelul 8). Frecvența bărbaților XX în populația generală fiind foarte rară (1 din 20.000), se identifică în cazul bărbaților azoospermici în 0,9% și normozoospermici de la 1-3% [14]. Sindromul de la Chapelle este un sindrom de inversare a sexului caracterizat printr-un cariotip

feminin în discordanță cu un fenotip masculin. Mai frecvent, acest sindrom în literatura de specialitate, se descrie sub formă de cazuri sporadice [15]. Mecanismul de producere a bolii în majoritatea cazurilor 80% este cauzat printr-un crosing-over inegal între cromozomii X și Y în timpul recombinării materialului genetic din profaza I a meiozei, având ca rezultat translocarea genei SRY de pe cromozomul Y pe cromozomul X sau pe cromozomii autozomali [16]. Datorită acestui fapt, se întâlnesc două categorii, SRY pozitivi în 80% din pacienți și restul 20% în SRY negativi [14]. Cazul prezentat tot se referă la categoria SRY pozitivi, fiind depistată prezența genei SRY prin examenul molecular genetic multiplex PCR, prin testul FISH a fost posibilă identificarea genei SRY pe cromozomul X. Datorită fenotipului, relativ, normal și a organelor de sexualizare, diagnosticarea timpurie a acestui sindrom este dificilă. Majoritatea pacienților fiind diagnosticați după pubertate, când sunt evidente hipogonadismul, azoospermia și incapacitatea de a concepe copii. Cazul descris a fost diagnosticat la vârsta tardivă de 40 de ani datorită aceleași cauze menționate anterior: azoospermie și infertilitate. Azoospermia se datorează lipsei genelor din regiunea AZF a cromozomului Y- Yq11.23 [14].



Figura 15. Cariotip 46,XX în toate celulele analizate la bărbat de 40 ani

(Metafaze numărate: 33; Metafaze cariotipate: 10; Nivelul de rezoluție al benzilor: 575 – 570)

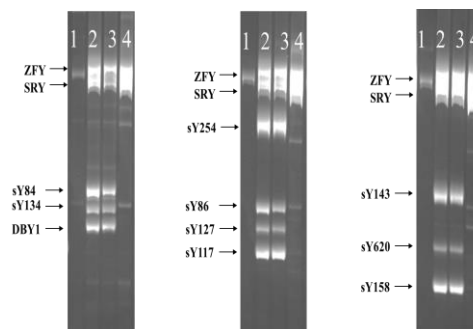


Figura 16. Rezultatul electroforezei pentru detectarea markerilor Y la bărbatul cu 46,XX

1 – Control feminin; 2, 3 – Bărbat normal; 4 – Bărbat cu deleții ale regiunii AZF (a, b, c)

În timpul consilierii genetice, în ceea ce privește posibilitatea de a concepe un copil, s-a recomandat posibilitatea de a înfia s-au utiliza spermă de la donator. În cazul pacienților cu DSD testiculară, nu se recomandă extragerea spermei testiculare, spermatogeneza reziduală nu poate fi prezentă în testicule. Evaluarea histologică a țesutului testicular al bărbaților XX denotă prezența Sindromului celulelor Sertoli și hiperplazia celulelor Leydig. În tratamentul pacienților 46,XX cu insuficiență testiculară, trebuie avută în vedere abordarea multidisciplinară, suportul psihologic este o parte importantă a abordării holistice [14].

4.2.4 Disgenezia gonadică mixtă la bărbat 45,X/46,XY

La un pacient cu azoospermie a fost identificat mozaicul 45,X/46,XY (Tabelul 8, Figura 17), ce se întâlnește rar cu o frecvență de 1/15.000 nou-născuți. Semnificația mozaicului 45,X/46,XY în sursele bibliografice este controversată și prezintă o mare provocare clinică, deoarece prezintă manifestări clinice de severitate variabilă de la probleme de fertilitate, organe genitale ambigue până la bărbați fenotipic normali [14].



Figura 17. Cariotip mozaic 45,X/3/46,XY[12] al pacientului cu vârsta de 46 ani

Mozaicismul 45,X/46,XY, denumit și disgeneză gonadică mixtă, este o aneuploidie rară a cromozomilor sexuali cu o prevalență de, aproximativ, 1 din 15.000 de nou-născuți [8]. Fenotipul

pacienților cu asemenea afecțiune este extrem de variabil de la ambiguitate sexuală, genitale preponderent feminine, până la fenotip normal. Variațiile fenotipice la persoanele cu cariotipul 45,X/46,XY pot corela cu gradul de mozaicism din sânge și testicule, raportul dintre numărul de celule 45,X vs 46,XY. În unele cazuri, bărbații cu mozaicul X/XY pot beneficia de TRA (Tehnici de Reproducere Asistată), cu riscul de transmitere a unor defecte genetice descendenților, situație ce necesită consiliere genetică și diagnostic prenatal [17].

4.2.5 Variații structurale microscopice ale cromozomului Y

Prin tehnici citogenetice, au fost identificate două cazuri cu variații structurale ale cromozomului Y: 46,X,del(Y)(q11.21) ($Y \leq 21$) și 46,XYqh+ ($Y \geq 18$) (Figura 18). Variantele polimorfe ale cromozomului Y (Yqh+) sunt menționate în câteva studii privind infertilitatea masculină, în principal, la bărbații cu azoospermie și oligozoospermie severă [18] Yqh+ reprezintă o variație a regiunii de heterocromatină constitutivă din cromozomul Y, ce nu poate explica direct tulburările spermatogenezei. Contrar, în cazurile $Y (\leq 21)$, similară cu cromozomul Y normal în morfologie și benzi, precum și în dimensiune, pot lipsi genele asociate cu spermatogeneza [19]. În cazul pacientului cu cariotipul 46,X,del(Y)(q11.21) - $Y (\leq 21)$, au fost deletate genele din regiunea AZFb+c (confirmate prin multiplexPCR).

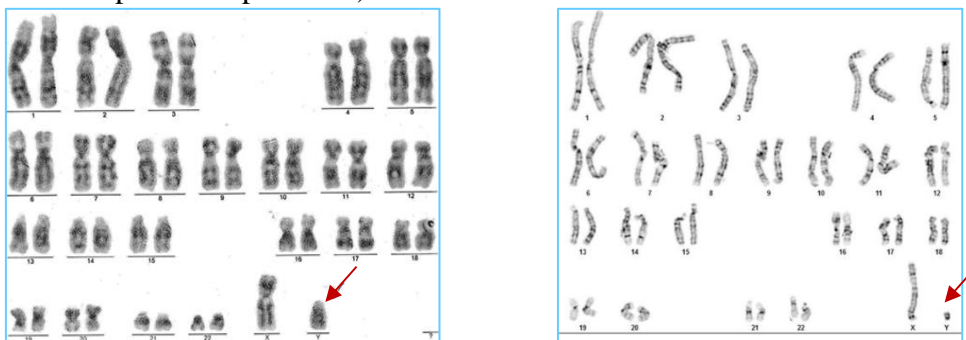


Figura 18. a) Cariotip: 46,XYqh+ ($Y \geq 18$) vârsta 30 ani b) 46,Xdel(Y)(q11.21) ($Y \leq 21$) vârsta 36 ani

4.2.6 Variații structurale ale cromozomilor autozomi

Testarea citogenetică a pacienților cu azoospermie a scos în evidență variații în structura unor cromozomi autozomi: 46,XY, t(1;19)(23.2q;q12.4); 46,XY,der(5),t(9;5); 45,XY,rob(13/14); 46,XY,inv(9)(p11q12); 46,XY,inv(9)(p13.21); 46,XY,15ps+; 46,XY,22sts; 46,XY,fra(17)(p12). În studiile de specialitate, sunt descrise variații ale cromozomilor autozomi la pacienții cu infertilitate, care frecvent nu se exprimă prin modificări fenotipice. În studiul actual, din numărul total ($n=96$) al bărbaților cu azoospermie se regăsesc în 8,3% ($n=8$) cazuri (Tabelul 9). Cele mai frecvente anomalii cromozomiale autozomale depistate au fost rearanjamentele cromozomiale echilibrate în 5 cazuri. Translocațiile sunt cele mai frecvente anomalii cromozomiale echilibrate. În cercetarea actuală, din 96 bărbați cu azoospermie translocații simple echilibrate au fost depistate în 2,1% ($n=2$) cazuri - t(1;19) și t(9;5). Într-un caz, a fost identificat o translocație robertsoniană, cu 45 de cromozomi, implicând brațele lungi ale unui cromozom din perechea 13 și unuia din perechea 14, în toate celulele analizate rob(13/14). Inversiile cromozomiale sunt cele mai frecvente rearanjamente cromozomiale echilibrate după translocații. În studiul actual, s-au identificat în 2,1% ($n=2$) cazuri din numărul total al bărbaților cu azoospermie. La ambii pacienți a fost identificată inversie pericentrică ce implică ambele brațe ale unui cromozom din perechea 9, în toate celulele analizate (Figura 19).



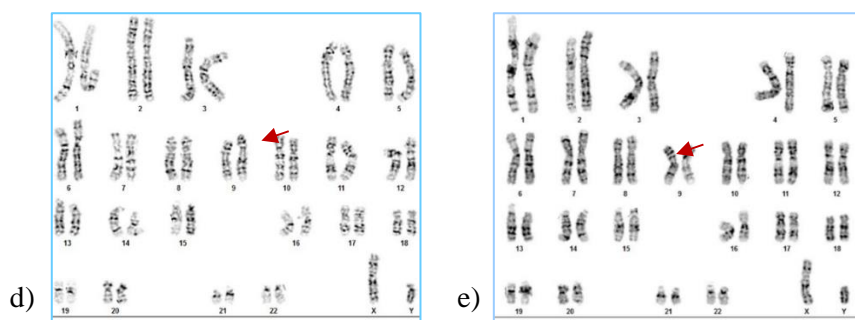


Figura 19. Cariotip: a) $46,XY,t(1;19)(q23.2;q13.4)$ vârsta 35 ani; b) $46,XY,der(5),t(9;5)$ vârsta 29 ani; c) $45,XY,rob(13;14)(q10;q10)$ vârsta 31 ani; d) $46,XY,inv(9)(p11q12)$ vârsta 35 ani; e) $46,XY,inv(9)(p13q21)$ vârsta 31 ani

Polimorfismele cromozomiale rămân, în continuare, una dintre cele mai interesante subiecte în genetică [5]. În studiul actual, au fost identificate în 2,1% (n=2) cazuri din 96 bărbați cu azoospermie. Un caz având o regiune satelitară mărită la nivelul brațului scurt al unuia dintre cromozomii din perechea 15 (15ps+) și altul din perechea cromozomului 21 (21ps+), (Figura 20).



Figura 20. Cariotip: a) $46,XY,15ps+$ vârsta 33 ani; b) $46,XY,22ps+$ vârsta 32 ani; c) $46,XY, fra(17)(p12)$ vârsta 36 ani

Într-un caz, la un bărbat azoospermic cu vârsta de 36 ani, a fost depistat un cariotip masculin cu 46 cromozomi, prezentând un situs fragil la nivelul brațului scurt al unuia dintre cromozomii din perechea 17 (regiunea 17p12), în toate celulele analizate (Figura 20).

4.3. Variații în genele AZF și gena CFTR la pacienții cu azoospermie testați molecular-genetic

Toți pacienții (n=96) cu azoospermie au fost testați molecular-genetic pentru analiza variațiilor în genele din regiunea AZF a cromozomului Y (multiplex PCR) și pentru mutațiile delF508 și G542X ale genei CFTR (PCR).

4.3.1 Microdeleții ale cromozomului Y la bărbații cu azoospermie

În cercetarea actuală, au fost diagnosticate în 25% (24/96) variații cromozomiale, dintre care asociate Sindromului Klinefelter 11,5% (11/96). La analiza molecular-genetică în 10,4% (10/96) au fost depistate delețiile regiunii AZF ale cromozomului Y, fiind similară cu cea raportată la pacienții din USA (10,4%), Japonia (11,1%) și China (11,7%) (Figura 21). Microdelețiile Y în regiunea AZF reprezintă a doua cauză genetică de infertilitate masculină, după anomaliile cromozomiale și în special SK, date confirmate în acest studiu [20].

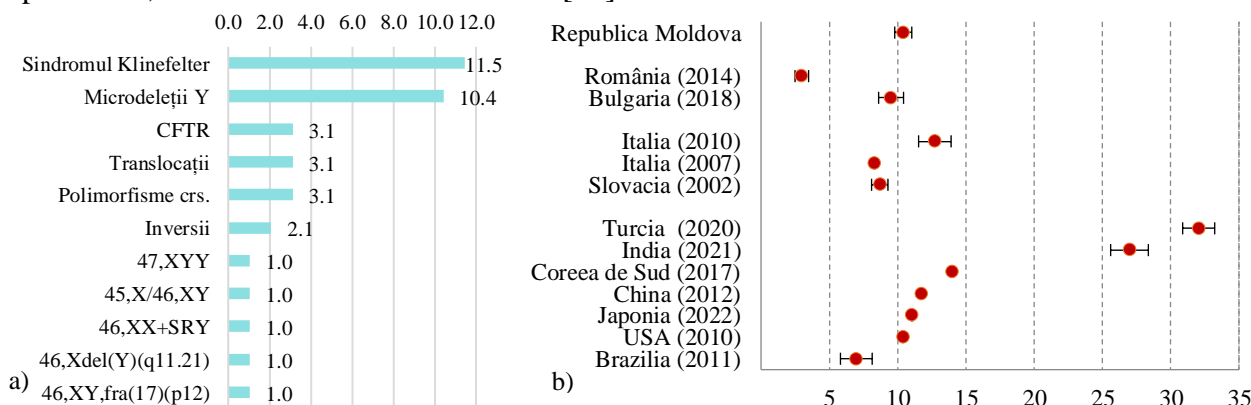


Figura 21. a) Prevalența microdelețiilor Y în raport cu alte cauze genetice la bărbații cu azoospermie, b) Forest plot pentru prevalența microdelețiilor Y în acest studiu comparativ cu alte studii similare

Microdelețiile Y sunt mai frecvente la bărbații infertili decât în populația generală, se găsesc la 3–5% dintre pacienții cu oligozoospermie și 6–16% dintre pacienții cu azoospermie. Incidența înaltă a microdelețiilor Y în rândul bărbaților cu spermograma sever afectată este, datorată, nemijlocit, delețiilor în regiunea AZF ce afectează genele, care controlează spermatogeneza [21].

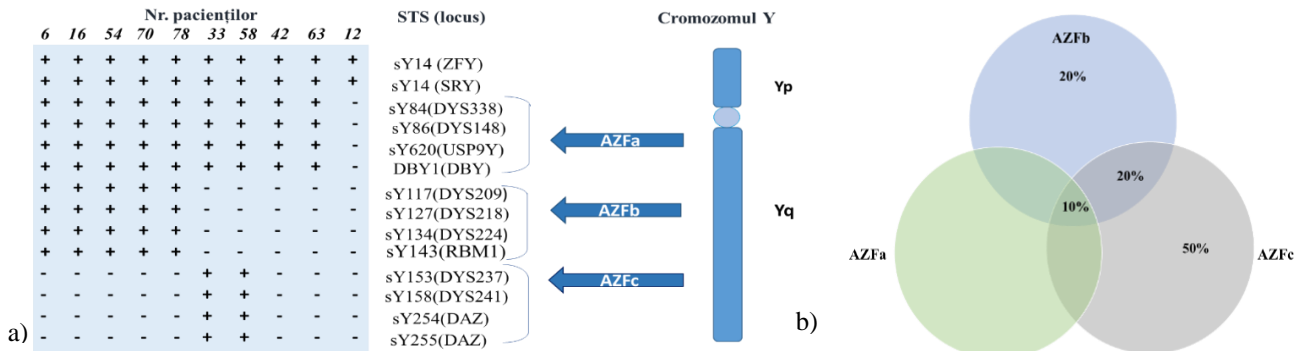


Figura 22. a) Diagrama schematică ce ilustrează diferite tipuri de deleție a markerilor STS la pacienții cu AZF deleții. +: produs PCR prezent; -: produs PCR lipsă, b) Diagrama Venn reprezintă prevalența diferitor tipuri de deleții AZF

Din numărul total (n=10) al pacienților cu microdeleții Y, cele mai frecvente sunt microdelețiile locusului AZFc, markerii lipsă au fost sY153, sY158, sY254 și sY255. Deleții izolate ale acestui locus au fost diagnosticate în 50% (n=5) din (n=10) pacienții azoospermici. În 20% (n=2) au fost depistați cu deleția regiunii AZFb, markerii lipsă fiind sY117, sY127, sY134, sY143. Deleții care afectează atât loci AZFb, cât și AZFc au fost identificate în 20% (n=2). Într-un singur caz, 10 % (n=1) au fost detectate microdeleții în fiecare regiune a AZFa-sY84, sY86, sY620, DBY1; AZFb-sY117, sY127, sY134, sY143; AZFc-sY153, sY158 sY254, sY255; și prezența genei SRY (regiunea care determină sexul pe Y). Deleții complete izolate ale regiunii AZFa nu au fost detectate la niciunul dintre pacienți (Figura 22). Bărbații cu deleții AZFc prezintă cel mai variabil fenotip, variind de la azoospermie completă până la oligozoospermie ușoară. Totuși, la majoritatea purtătorilor cu AZFc deleții, spermatogeneza este finalizată, dar pe o scară redusă, de obicei, mai puțin de 2 milioane/ml rezultând oligozoospermie severă. Conform rapoartelor, din multiple studii la pacienții cu deleții AZFc, spermatozoizii maturi sunt obținuți în, aproximativ, 50% prin tehnica TESE, în ciuda ratelor reduse de fertilizare și a scorurilor embrionare mai slabe după ICSI [22]. În studiul actual, biopsia testiculară a fost efectuată la 3 pacienți cu deleție AZFc pentru recuperarea spermei, cu toate acestea, nu am găsit la nici un pacient, spermatozoizi maturi suficienți pentru ICSI. Deleția AZFb poate fi asociată cu oprirea dezvoltării celulelor germinale în stadiul de pahiten rezultând azoospermie sau SCOS [20].

4.3.2 Mutații în gena CFTR la bărbații cu azoospermie

În urma evaluării moleculare genetice a mutațiilor delF508 și G542X ale genei CFTR la pacienții (n=96) cu azoospermie, în 3,1% (n=3) cazuri au fost depistați ca purtători ai mutației în gena CFTR-N/ΔF508 (Figura 23). Fibroza chistică (FC) este cea mai frecventă afecțiune autozomal recesivă, care afectează, aproximativ, 70.000 de oameni din întreaga lume caracteristică populației cauziene. Manifestările clinice ale bolii sunt cauzate de defecte ale proteinei Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator, determinate de mutații în gena CFTR. Mutația ΔF508 este cea mai frecventă, aproximativ, 50-80% [23].

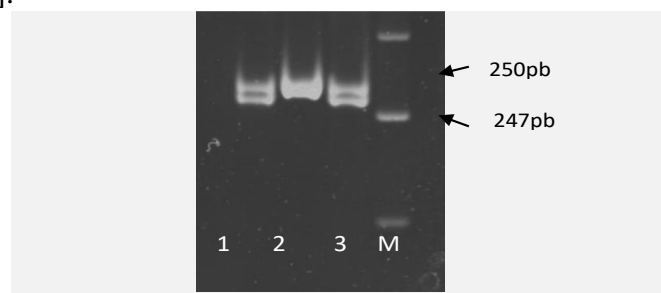


Figura 23. Electroforeograma pentru mutația del F508 în gena CFTR
1, 3: bărbat heterozigot (N/delF508); 2: bărbat homozigot (N/N)

Mutațiile din gena CFTR perturbă funcția canalelor de clor, împiedicându-le să regleze fluxul de ioni și apă prin membranele celulare. Ca rezultat, celulele din tractul genital masculin produc mucus de o consistență vâscoasă. La toți pacienții heterozigoți cu alele N/ΔF508 s-a efectuat biopsie testiculară, unde s-au identificat spermatozoizi pentru ICSI și ulterior au optat pentru FIV. Pentru cuplurile în care partenerul masculin are mutații în gena CFTR, testarea partenerului feminin și consilierea genetică sunt foarte importante înainte de TRA, pentru a estima riscurile și posibilele corelații genotip-fenotip. Astfel, pentru calcularea riscului de recurență la descendenți au fost, de asemenea, investigate soțiile lor, care au fost homozigote NN. Toții (n=3) pacienții purtători de mutații ΔF508 au prezentat absența bilaterală a vaselor deferente (CBAVD). CBAVD este o boală congenitală de dezvoltare (1:1000 bărbați) caracterizată prin lipsa ambelor canale deferente. Prevalența CBAVD la bărbații azoospermici este estimată la 4-17% și crește până la 25% în cazul azoospermiei obstructive. Absența vaselor deferente este asimptomatică din punct de vedere clinic și atunci când CBAVD este singura manifestare la un pacient, atunci, în majoritatea cauzelor, găzduiește cel puțin o mutație a genei CFTR. Această afecțiune este cunoscută ca forma genitală a fibrozei și poate fi denumită FC-CBAVD [24].

4.5. Consultul genetic în cuplurile infertile datorate azoospermiei în contextul procedurii de reproducere asistată

Azoospermia este cea mai severă cauză de infertilitate masculină în cuplu, bărbații azoospermici suferă de absența spermatozoidelor în ejaculat. Confirmarea unui diagnostic clinic prin testare genetică poate conduce la un management medical personalizat. Simptomele clinice similare pot fi rezultatul diferitelor variații genetice. Mai exact, în situații clinice mai rare, evaluările genetice pot contribui la identificarea specifică a bolii sau la confirmarea unui diagnostic suspect [25].

Tabelul 11. Opțiuni de tratament reproductiv al pacienților cu microdeleții ale cromozomului Y în cadrul Tehnicilor de Reproducere Asistată [22] [25]

Fenotip	Cauza Genetică	Frecvența	Test	TRA	Moștenire
Masculin normal FSH ↔ ↑ LH Normozoospermie- Azoospermie	Microdeleții cromozomul Y	1/2.500 10-15% în azoospermie; 3-7% în oligozoospermie	Diagnostic Molecular genetic PCR STS regiunea Y; ZFY; SRY	În conformitate tipului de deleție	
Azoospermie/ Oligozoospermie severă	Y-AZF c deleție	AZFc del- 60%	STSY- regiunea AZFc sY254- genaDAZ sY255- DAZ sY153- DYS237 sY158- DYS241	micro-TESE + ICSI	De novo/ Y linkată Consiliere genetică/ AZFc del- transmitere la băieți; PGD
Azoospermie/ Blocarea spermatogenezei	Y-AZF b deleție	AZFb del 1-5%	STSY- regiunea AZFb sY117-DYS209 sY127-DYS218 sY134-DYS224 sY143-RBMY		
Azoospermie /Sindromul SCO/Blocarea spermatogenezei	Y-AZFb+c deleție	AZFbc del- 22%	STSY- regiunea AZFc combinat cu AZFb	Donator spermă FIV	De novo Nu se transmite la urmași
Azoospermie/ Sindromul SCO	Y-AZFa deleție	AZFa del- 3%	STSY- regiunea AZFa sY84- DYS388 sY86- DYS148 DBY1- DBY sY620- USP9Y		
Azoospermie/ Sindromul SCO	Y-AZFabc Deleție	1	STSY- regiunea AZFc combinat cu AZFb și AZFc	Donator spermă FIV	

TRA- SCO - Sindromul Celulelor Sertoli; PCR – Reacția de polimerizare în lanț; STS- PGD- Diagnostic Genetic Preimplantațional; FSH - Hormonul Foliculostimulant; LH - Hormonul Luteinizant; ↑ - mărit; ↔ norma; FIV- Fertilizare în vitro; TESE

Consilierea genetică, în cadrul tehnicilor de reproducere, ar trebui să se bazeze pe următoarele direcții:

- i. Un cuplu în care bărbatul are infertilitate datorată microdelețiilor cromozomului Y se poate oferi opțiunea de fertilizare in vitro, folosind ICSI (injecție intracitoplasmatică de spermă). În această procedură, spermatozoidii prelevați din ejaculat (la bărbații cu oligozoospermie) sau extrași din biopsii testiculare (la bărbații cu azoospermie) sunt injectați prin ICSI într-un ovul recoltat prin FIV (fertilizare în vitro) [25]. În practica clinică, indicația pentru TESE sau micro-TESE

chirurgicală pentru pacienții azoospermici trebuie luată în considerare pe baza rezultatelor testelor moleculare genetice a tipului de deleție AZFa, AZFb, AZF b,c și AZFc (Tabelul 11).

- ii. Dacă bărbatul este purtător al unei anomalii autozomale echilibrate, cuplul trebuie informat că rata de succes este variabilă și că există un risc crescut de avort spontan. Cuplul ar trebui să fie sfătuit că fătul lor poate fi: afectat de o anomalie cromozomială, care poate provoca multiple anomalii congenitale, retard mintal sau; fătul poate fi normal sau; fătul poate avea aceeași anomalie cromozomială ca și tatăl, ceea ce duce la o fertilitate redusă sau infertilitate. Dacă bărbatul este purtător al unei anomalii structurale, care implică doar cromozomii sexuali, există un risc crescut de transmitere a infertilității și, eventual, a altor tulburări sau malformații (Tabelul 12, Tabelul 13).

Tabelul 12. Opțiuni de tratament reproductiv al pacienților cu anomalii cromozomiale echilibrate în cadrul Tehnicilor de Reproducere Asistată [5][19]

Fenotip	Cauza genetică /frecvența	Test	TRA
Normospermia până la azoospermia; FSH ↔; Testosteron ↔; Majoritatea fenotip normal.	<i>Anomalii crs. de structură echilibrate</i> 5% din bărbații infertili	Examenul citogenetic/cariotipare FISH	FIV oligozoospermie microTESE/TESE azoospermie PGD
	<i>Translocații reciproce:</i> 0,9/1000 n.n. 0,5- 0,9% azoospermie, 0,6% oligozoospermie,	46,XY,t(1;19) 46,XY,t(9;5) etc.	
	<i>Translocații robertsoniene:</i> 0,5% azoospermie, 1,6% oligozoospermie.	45,XY,rob(13;14) 45,XY,rob(14;21) etc.	
	<i>Inversii:</i>	46,XY,inv(9)(p11q12) 46,XY,inv(9)(p13.21) etc.	

PGD - Diagnostic Genetic Preimplantațional; FSH - Hormonul Foliculostimulant; LH - Hormonul Luteinizant; ↑ - mărit; ↔ norma; FIV- Fertilizare în vitro; microTESE - Microscopic testicular retrieval of sperm

- iii. Bărbații azoospermici cu mutații în gena CFTR pot concepe copii prin TRA. Un bărbat afectat (aa) va transmite câte o alelă cu mutație a genei CFTR care cauzează boala fiecăruia dintre urmașii săi. Testarea genetică moleculară CFTR ar trebui să fie oferită partenerului său de reproducere pentru a determina statutul ei de purtător CFTR. Dacă partenerul de reproducere este purtător de mutația în gena CFTR, descendenții lor vor prezenta riscul pentru FC sau CBAVD în 25% [26].

Tabelul 13. Opțiuni de tratament reproductiv al pacienților cu anomalii cromozomiale în cadrul Tehnicilor de Reproducere Asistată [5] [17]

Fenotip	Cauza genetică /frecvența	Test	TRA	Moștenire
Azoospermia, oligozoospermia; FSH ↑, LH ↑ Testosteron ↓; statura înaltă, testicule mici, infertilitate, ginecomastie; tulburări neurocognitive, sindrom metabolic, etc.	XXY/Sindromul Klinefelter 1/700 nou-născuți de sex masculin; 10-15% în azoospermie, 2-5% oligozoospermie.	Examenul citogenetic/cariotip Forma clasică 47,XXY (80-90%) Forma mozaică 46,XY/47,XXY (6-7%) Polisomia X 48,XXXXY 49,XXXXXY etc. (3-8%)	-la pacienții cu oligozoospermie/FIV + ICSI -la pacienții cu azoospermie până la vârsta de 35 ani/micro TESE+ ICSI -la pacienții diagnosticați prepubertar în perioada pubertară consilierea genetică privind crioconservarea spermatozoizilor micro TESE	De novo
Azoospermia, Oligozoospermia, FSH ↔ ↑, LH ↑, Testosteron ↔ ↓; statură joasă, organe genitale masculine, criptoorhidism, hipospadias, ginecomastie, infertilitate.	XX la bărbați/ Sindromul de la Chapelle Cazuri rare 1:20.000 nou născuți	Examenul citogenetic/cariotip 46,XX+SRY (80%); FISH – prezența genei SRY; PCR- lipsa regiunii AZFa, AZFb, AZFc, prezența genei SRY 46,XX+SRY (20%); FISH – lipsa genei SRY; PCR- lipsa regiunii AZFa, AZFb, AZFc,	Utilizarea spermei de la donator (ulterior FIV).	AD
Normospermia până la Azoospermia, FSH ↔ ↑, Testosteron ↔ ↓; Majoritatea fenotip normal, Minoritatea Statură înaltă, TSA.	YYY/Sindromul Jacobs 1/1.000 nou-născuți 0,4% oligozoospermie	Examenul citogenetic/cariotip Forma omogenă 47,YYY Forma mozaică 46,XY/47,XXY	FIV sau ICSI în cazul pacienților cu oligozoospermie micro TESE+ ICSI în cazul pacienților cu azoospermie	Nu este clar

TSA - Tulburări ale spectrului de Autism; PGD- Diagnostic Genetic Preimplantațional; FSH - Hormonul Foliculostimulant; LH - Hormonul Luteinizant; ↑ - mărit; ↔ norma; ↓ micșorat; FIV- Fertilizare în vitro; microTESE - Microscopic testicular retrieval of sperm

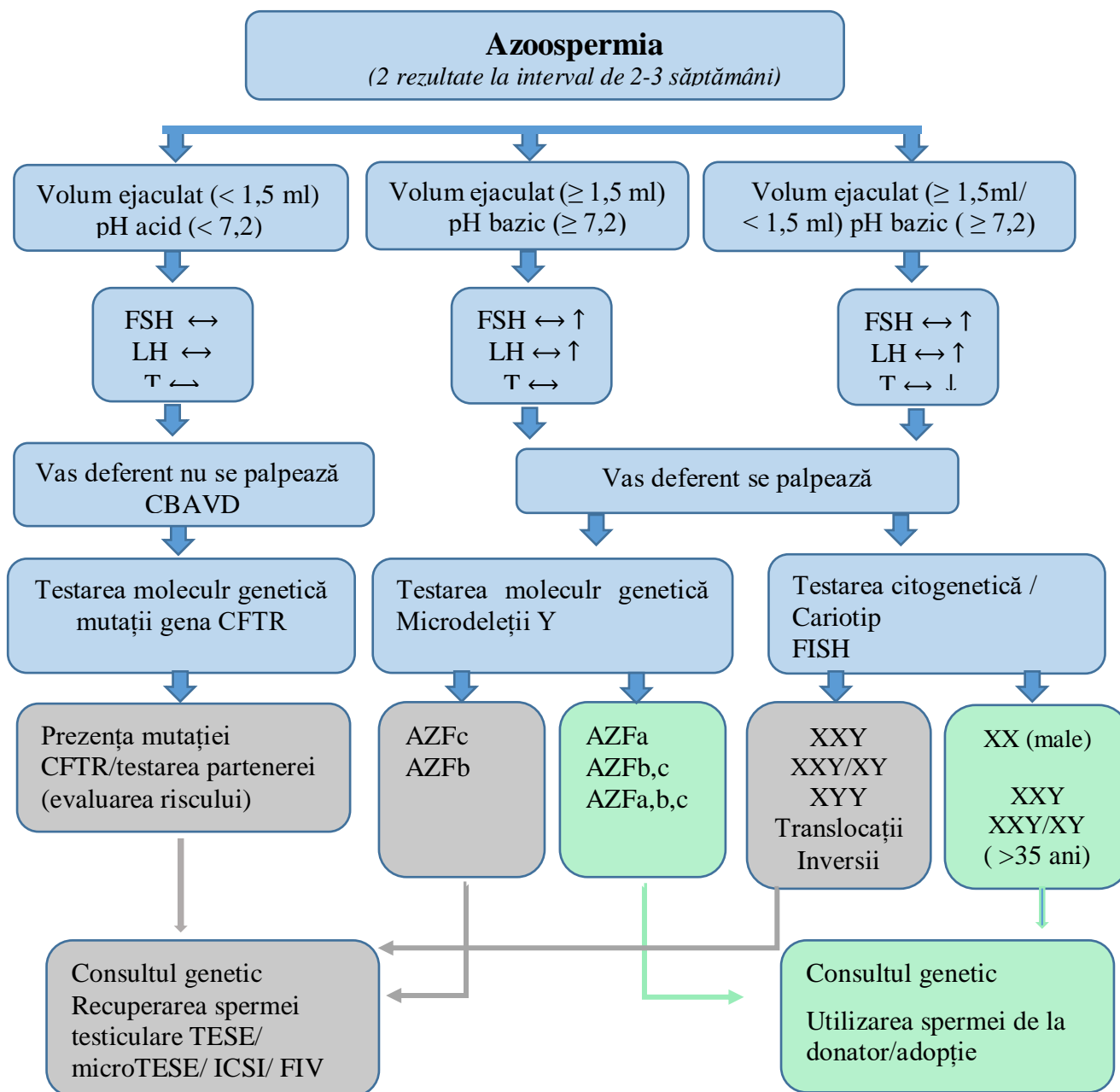


Figura 24. Algoritm de diagnostic genetic pentru mutații în gena CFTR, Microdeleții Y și anomalii cromozomiale la bărbații cu azoospermie

FSH - Hormonul Foliculostimulant; LH - Hormonul Luteinizant; ↑ mărit; ↔ norma; ↓ micșorat; TESE - Testicular Sperm Extraction; microTESE - Microscopic testicular retrieval of sperm; FIV – Fertilizarea în vitro; CBAVD - Congenital Bilateral Absence of the Vas Deferens; CFTR - Cystic Fibrosis Transmembrane conductance Regulator

CONCLUZII GENERALE

1. Studiul parametrilor materialului seminal prin evaluarea a 5676 spermograme, pe perioada anilor 2012-2020, a demonstrat un declin semnificativ statistic ($p < 0,05$) pentru toți indicatorii calitativi și cantitativi a spermogramei; o descreștere a normozoospermiei cu 7,6% pe an; o creștere a oligozoospermiei cu 5,2%, astenozoospermiei cu 13,7% și oligoastenozoospermiei cu 1,0% pe an; o adresabilitate sporită a pacienților tineri (în 2012 – media vârstei a fost $41,4 \pm 5,5$ ani, iar în anul 2020 a fost $33,5 \pm 5,5$ ani); ceea ce ar reprezenta indirect o regresie a sănătății reproductive masculine.

2. Vârsta medie a bărbaților cu azoospermie pe întregul eșantion ($n=96$) a fost de $33,8 \pm 5,3$ ani, (IÎ 95%: 32,7 – 34,9; mediana: 33,0), media istoriei infertilității de $6,5 \pm 4,6$ ani, (IÎ 95%: 5,6 – 7,5).

3. Investigațiile citogenetice realizate la pacienții cu azoospermie ($n=96$) au identificat variații ale cariotipului în 25,0% cazuri, dintre care cu anomalii ale cromozomilor sexuali 16,7%: 47,XXY – sindromul Klinefelter (11,5%); variații structurale microscopice ale cromozomului Y (2,1%); câte

un caz 47,XXX – Sindromul Jacobs; 46,XX – inversia de sex la bărbat, 45,X/46,XY - disgenesia gonadică mixtă: și cu anomalii ale cromozomilor autozomi în 8,3%: translocatii – (3,1%); inversii – (2,1%), polimorfisme cromozomiale – (2,1%) și un caz cu 46,XY, fra(17)(p12).

4. Evaluarea regiunii AZF a cromozomului Y prin tehnica multiplex PCR la pacienții cu azoospermie (n=96) a identificat deleții în regiunea AZF în 10,4% de cazuri: deleția regiunii AZFc (5,2%); AZFb (2,08%), AZFbc (2,08%), AZFabc (1,0%).

5. Evaluarea mutațiilor genei CFTR (delF508 și G542X) prin testul PCR la pacienții cu azoospermie (n=96) a identificat mutație heterozigotă N/ΔF508 în 3,1% cazuri, iar testarea partenerelor la aceleași mutații CFTR a identificat statut de homozigot sănătos.

6. Corelarea particularităților fenotipice ale pacienților cu azoospermie (n=96) cu rezultatele testelor genetice evidențiază: la pacienții cu mutații în gena CFTR s-au înregistrat valori <1,5 ml ale volumului și valori < 7,2 ale pH-ului materialului seminal, comparativ cu pacienții cu cariotip anormal sau deleții AZF; la subiecții cu cariotip anormal s-au depistat valori înalte ale FSH, LH versus pacienții cu deleții AZF sau mutații în gena CFTR; la bărbații cu aneuploidii ale cromozomului X s-au înregistrat hipogonadismul și ginecomastia; pacienții cu mutații în gena CFTR au prezentat CBAVD.

7. Consultul și sfatul genetic a cuplului infertil oferă posibilitatea confirmării diagnosticului clinic, elucidarea cauzei infertilității, evaluarea riscului de transmitere a anomaliilor genetice la descendenți, alegerea unei strategii diagnostic-terapeutice reproductive personalizate.

RECOMANDĂRI PRACTICE

1. Evaluarea simultană a partenerului feminin și masculin în cuplurile ce se confruntă cu infertilitatea.
2. Abordarea complexă clinică, paraclinică și genetică a cuplurilor infertile datorate azoospermiei în cadrul unor echipe multidisciplinare ce includ specialiști din domeniul andrologiei, urologiei, medicinei reproductive, psihologiei și geneticii.
3. Abordarea personalizată a pacientului cu azoospermie în scopul elucidării cauzei infertilității, evaluării riscului genetic în cazul asocierii variațiilor genetice și selectării corecte a opțiunilor în tratamentul de reproducere asistată.
4. Pacienții cu azoospermie ce prezintă:
 - volumul ejaculatului < 1,5 ml, pH-ul < 7,2 și valori normale de FSH, necesită a fi testați pentru mutațiile genei CFTR;
 - volumul ejaculatului ≥ 1,5 ml și pH-ul ≥ 7,2 și valori normale de FSH necesită a fi investigați pentru delețiile în regiunea AZF;
 - volumul ejaculatului ≥ sau < 1,5 ml și pH-ul ≥ 7,2 și valori normale sau ridicate de FSH trebuie să fie investigați citogenetic.
5. Indicațiile pentru TESE sau micro-TESE chirurgicală pentru pacienții azoospermici necesită luate în considerare în baza rezultatelor testelor citogenetice și molecular-genetice:
 - pacienților cu anomalii cromozomiale de număr sau de structură și pacienților cu microdeleții ale cromozomului Y - deleție AZFb și AZFc, se recomandă microTESE;
 - pacienților cu mutații în gena CFTR se recomandă recuperarea spermatozoizilor prin TESE;
 - pacienților tineri cu sindromul Klinefelter se recomandă microTESE și crioconservarea spermatozoizilor.

BIBLIOGRAFIE SELECTIVĂ

1. DATTA, J. et al. Prevalence of infertility and help seeking among 15 000 women and men. In: *Human reproduction Oxford, England*. 2016. Vol. 31, nr. 9, pp. 2108-2118. DOI 10.1093/HUMREP/DEW123. ISSN:1460-2350
2. AZIMI, C., KHALEGHIAN, M., FARZANFAR, F. A retrospective chromosome studies among Iranian infertile women: Report of 21 years. In: *Iranian Journal of Reproductive Medicine*. 2013. Vol. 11, nr. 4, pp. 315. ISSN:2008-2177
3. AMERICAN SOCIETY FOR REPRODUCTIVE M. Report on evaluation of the azoospermic male. In: *Fertility and sterility*. 2006. Vol. 86, nr. 5 Suppl 1, pp. S210-S215. DOI 10.1016/J.FERTNSTERT.2006.08.030. ISSN:1556-5653
4. HAMADA, A.J., ESTEVES, S.C., AGARWAL, A. A comprehensive review of genetics and genetic testing in azoospermia. In: *Clinics*. 2013. Vol. 68, nr. Suppl 1, pp. 39. DOI 10.6061/CLINICS/2013(SUP01)06. ISSN:1807-5932
5. KATE, U. V. et al. Chromosomal Aberrations and Polymorphic Evaluation in Males with Primary Infertility from Indian Population. In: *Journal of Clinical and Diagnostic Research*. 2014. Vol. 8, nr. 10, pp. SC01-SC06. DOI 10.7860/JCDR/2014/8644.4933. ISSN:0973-709X
6. RACOVITA, S. et al. Development of semen quality in male partners of infertile couples in the Republic of Moldova. In: *One Health & Risk Management*. 2020. Vol. 1, nr. 1, pp. 36-41. DOI 10.38045/OHRM.2020.1.06. ISSN:2587-3466
7. RACOVITA, S., SPRINCEAN, M., MOSIN, V. Decline of semen quality among males consulted for couple infertility in the Republic of Moldova. In: *Archives of the Balkan Medical Union*. 2022. Vol. 57, nr. 2, pp. 152-162. DOI 10.31688/ABMU.2022.57.2.04. ISSN:1584-9244
8. RACOVITA, S. et al. Chromosomal abnormalities in men with azoospermia. In: *Moldovan Medical Journal*. 2021. Vol. 64, nr. 1, pp. 50-55. DOI 10.5281/zenodo.4527139.
9. SPRINCEAN M. et al. Aspecte ale diagnosticului timpuriu și particularitățile polimorfismului clinic și citogenetic în sindromul Klinefelter. In: *Analele Științifice ale USMF „N. Testemițanu”*. 2013. Vol. 14, nr. 5, pp. 426-433. ISSN:1857-1719

10. RACOVITĂ, S. et al. Variații cromozomiale la bărbații infertili. In: *Buletinul Academiei de Științe a Moldovei. Științe Medicale*. 2020. Vol. 67, nr. 3, pp. 78-82. ISSN:1857-0011
11. FLANNIGAN, R., SCHLEGEL, P.N. Genetic diagnostics of male infertility in clinical practice. In: *Best Practice & Research Clinical Obstetrics & Gynaecology*. 2017. Vol. 44, pp. 26-37. DOI 10.1016/J.BPOBGYN.2017.05.002. ISSN:1521-6934
12. KIM, I.W. et al. 47,XXY Syndrome and Male Infertility. In: *Reviews in Urology*. 2013. Vol. 15, nr. 4, pp. 188. DOI 10.3909/riu0580. ISSN:1523-6161
13. RACOVITĂ, S. et al. Sindromul 47,XXY asociat cu infertilitatea masculină: raport de caz clinic. In: *Buletin de Perinatologie*. 2020. Vol. 86, nr. 1, pp. 112-115. ISSN:1810-5289
14. RACOVITĂ, S. et al. Bărbat 46,XX, raport de caz clinic. In: *Buletin de Perinatologie*. 2019. Vol. 83, nr. 2, pp. 104-107. ISSN:1810-5289
15. AKINSAL, E.C. et al. Ten cases with 46,XX testicular disorder of sex development: single center experience. In: *International Brazilian Journal of Urology*. 2017. Vol. 43, nr. 4, pp. 770. DOI 10.1590/S1677-5538.IBJU.2016.0505. ISSN:1677-6119
16. DOMINGUEZ-LOPEZ, M. et al. Clinical case report: male patient with SRY-positive 46,XX testicular disorder of sex development. In: *Endocrine Abstracts*. 2013. Vol. 32, pp. 288. DOI 10.1530/ENDOABS.32.P288. ISSN:1470-3947
17. KILIC, S. et al. Assisted reproductive treatment applications in men with normal phenotype but 45,X/46,XY mosaic karyotype: clinical and genetic perspectives. In: *Taiwanese journal of obstetrics & gynecology*. 2010. Vol. 49, nr. 2, pp. 199-202. DOI 10.1016/S1028-4559(10)60042-3. ISSN:1875-6263
18. RACOVITĂ, S. et al. Clinical and genetic study in male infertility with azoospermia. In: *Abstract book*. Universitatea de Stat de Medicină și Farmacie „Nicolae Testemițanu” din Republica Moldova, 2021. p. 393. ISBN:978-9975-82-223-7.
19. LI, D. et al. Chromosomal abnormalities in men with pregestational and gestational infertility in northeast China. In: *Journal of Assisted Reproduction and Genetics*. 2012. Vol. 29, nr. 8, pp. 829-836. DOI 10.1007/S10815-012-9783-1. ISSN:1058-0468
20. RACOVITA, S. et al. Y chromosome microdeletions in men with severe spermatogenic defects. In: *International Journal of Current Research*. 2021. Vol. 13, nr. 03, pp. 16428-16433. DOI 10.24941/ijcr.40899.03.2021. ISSN:
21. ELSAID, H.O.A. et al. Detection of AZF microdeletions and reproductive hormonal profile analysis of infertile sudanese men pursuing assisted reproductive approaches. In: *BMC Urology*. 2021. Vol. 21, nr. 1, pp. 1-9. DOI 10.1186/s12894-021-00834-3. ISSN:1471-2490
22. CHOI, D.K. et al. Detection of Y chromosome microdeletion is valuable in the treatment of patients with nonobstructive azoospermia and oligoasthenoazoospermia: Sperm retrieval rate and birth rate. In: *Korean Journal of Urology*. 2013. Vol. 54, nr. 2, pp. 111-116. DOI 10.4111/KJU.2013.54.2.111. ISSN:2005-6737
23. CHEN, H. et al. Regulation of male fertility by CFTR and implications in male infertility. In: *Human reproduction update*. noiembrie 2012. Vol. 18, nr. 6, pp. 703-713. DOI 10.1093/HUMUPD/DMS027. ISSN:1460-2369
24. CIOPPI, F., ROSTA, V., KRAUSZ, C. Genetics of azoospermia. In: *International Journal of Molecular Sciences*. 2021. Vol. 22, nr. 6. DOI 10.3390/ijms22063264. ISSN:14220067
25. KURODA, S. et al. Genetic disorders and male infertility. In: *Reproductive Medicine and Biology*. 2020. Vol. 19, nr. 4, pp. 314-322. DOI 10.1002/rmb2.12336. ISSN:14470578
26. MOSKOWITZ, S.M. et al. Clinical practice and genetic counseling for cystic fibrosis and CFTR-related disorders. In: *Genetics in medicine: official journal of the American College of Medical Genetics*. 2008. Vol. 10, nr. 12, pp. 851-868. DOI 10.1097/GIM.0B013E31818E55A2. ISSN:1530-0366

LISTA ABREVIERILOR

OMS	Organizația Mondială a Sănătății
RM	Republica Moldova
CFTR	Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator
FIV	Fertilizarea în Vitro
CBAVD	Absența congenitală bilaterală a canalului deferent
CUAVD	Absența congenitală unilaterală a canalului deferent
ISCN	International System for Human Cytogenetic Nomenclature
FSH	Hormonul de Stimulare Foliculară
LH	Hormonul Luteinizant
HH	Hipogonadismul Hipogonadotrop
microTESE	Extragerea microchirurgicală de spermă
TESE	Recuperarea spermei testiculare
PAR	Regiunile pseudoautozomale
SRY	Sex determining region chromosome Y
STS	Sequence-tagged-sites
ADN	Acid Deoxiribonucleic
ARN	Acid Ribonucleic
GTG	G banding by Giemsa with the use of trypsin
inv	Inversion / Inversie pe cromozom
ins	Insertion / Inserție pe cromozom
t	Translocare reciprocă
rob	Translocare robertsoniană
del	Deletion / Deleție pe cromozom
dup	Duplication / Duplicație pe cromozom
DAZ	Gena - Deleted in Azoospermia
USP9Y	Gena - Ubiquitin Specific Protease on Y chromosome 9
DBY	Gena - Dead Body Y
XIST	Gena - X Inactive Specific Transcript
BPY2	Gena - Basic protein on Y chromosome 2
CDY	Gena - Chromodomain protein, Y chromosome
GOLGA2LY	Gena - Golgi Autoantigen, Golgin Subfamily a2 Like Y
CSPG4LY	Gena - Chondroitin sulfate proteoglycan 4 Like Y
TTY	Gena - Testis-specific transcript
UTY	Gena - Ubiquitous TPR motif on the Y
SCOS	Sertoli cells only Syndrome
PGD	Preimplantation Genetic Diagnosis
FISH	Hibridizare Fluorescentă în Situ
SK	Sindromul Klinefelter
AZF	Azoospermia Factor

LISTA PUBLICAȚIILOR ȘI MANIFESTĂRILOR ȘTIINȚIFICE
la care au fost prezentate rezultatele cercetărilor
la teza de doctor în științe medicale,
cu tema "Variații genetice în infertilitatea masculină cu azoospermie"
315.02 – Biologie Moleculară și Genetică Medicală,
a dnei Racoviță Stela, asistent universitar,
Universitatea de Stat de Medicină și Farmacie „Nicolae Testemițanu”

LUCRĂRI ȘTIINȚIFICE

- **Articole în reviste științifice peste hotare:**
- ✓ **articole în reviste ISI, SCOPUS și alte baze de date internaționale***
- 1. Racoviță S., Sprincean M., Mosin V. Decline of semen quality among males consulted for couple infertility in the Republic of Moldova. *Archives of the Balkan Medical Union*. 2022;57(2):152-162. ISSN: 1584-9244. DOI: 10.31688/ABMU.2022.57.2.04. (IF:0,23)
- ✓ **articole în reviste din străinătate recenzate:**
- 2. Racoviță S., Capcelea S., Boiciuc K., Moșin V., Revenco N., Hadjiu S., Sprincean M. Clinical and genetic particularities in male infertility. *Romanian Journal of Child and Adolescent Neurology and Psychiatry*. 2019;25 (3): 61-70. ISSN: 2068-8040.
- 3. Racoviță S., Moșin V., Hadjiu S., Revenco N., Sprincean M. Behavioral and psychiatric aspects of infertile 47,XXY patient. *Romanian Journal of Child and Adolescent Neurology and Psychiatry*. 2020;26(2):75-85. ISSN: 2068-8040.
- 4. Racoviță S. Clinical and cytogenetic polymorphism in Klinefelter Syndrome. *Romanian Journal of Child and Adolescent Neurology and Psychiatry*. 2022;28(2):34-42. ISSN: 2068-8040.
- 5. Sprincean M., Hadjiu S., **Racoviță S.**, Halabudenco E., Samoilenko T., Mișina A., Egorov V., Lupușor N., Grîu C., Feghiu L., Cuzneț L., Călcîi C., Revenco N. Differential diagnosis of chromosomal pathologies in children. *Romanian Journal of Child and Adolescent Neurology and Psychiatry*. 2020;26(2):47-63. ISSN: 2068-8040.
- **Articole în reviste științifice naționale acreditate:**
- ✓ **Articole în reviste de categoria B+**
- 6. Racoviță S., Moșin V., Capcelea S., Mișina A., Sprincean M. Chromosomal abnormalities in men with azoospermia. *Moldovan Medical Journal*. 2021;64(1):50-55. ISSN: 2537-6373. DOI: 10.5281/zenodo.4527139.
- ✓ **Articole în reviste de categoria B**
- 7. Racoviță S., Moșin V., Capcelea S., Ponetenco D., Boiciuc K., Sprincean M. Bărbat 46,XX, Raport de caz clinic. *Buletin de perinatologie*. 2019; 2(83):104-107. ISSN 1810-5289.
- 8. Racoviță S., Moșin V., Hadjiu S., Ponetenco D., Revenco N., Sprincean M. Syndrome 47,XXY associated with men's infertility: clinical case report. *Buletin de Perinatologie*. 2020, 1(86):112-115. ISSN 1810-5289.
- 9. Sprincean M., Hadjiu S., Halabudenco E., Fuior L., **Racoviță S.**, Egorov V., Barbova N., Călcîi C., Revenco N. Role of medico-genetic counseling and prenatal screening in diagnosis of renal urinary pathology in fetus. *Buletin de Perinatologie*. 2020;2(87):32-38. ISSN: 1810-5289.
- 10. Racoviță S., Sprincean M., Ponetenco D., Gorduza EV., Mosin V. Development of semen quality in male partners of infertile couples in the Republic of Moldova. *One Health and Risk Management*. 2020;1(1):36-41. ISSN:2587-3458. Doi:10.38045/OHRM.2020.1.06. (DOAJ)
- ✓ **Articole în reviste de categoria C**
- 11. Racoviță S., Sprincean M., Moșin V., Hadjiu S., Barbova N., Halabudenco E., Mișina A., Samoilenko T., Chesov E., Guțuleac R., Revenco N. Polimorfism clinic și variații citogenetice în infertilitatea masculină cauzată de Sindromul Klinefelter. *Buletinul Academiei de Științe, Științe Medicale*. 2018;1(58):44-48. ISSN 1857-0011.
- 12. Racoviță S., Capcelea S., Moșin V., Halabudenco E., Mișina A., Samoilenko T., Hadjiu S., Sprincean M. Variații cromozomiale la bărbații infertili. *Buletinul Academiei de Științe, Științe Medicale*. 2020;3(67):78-82. ISSN 1857-0011.
- **Articole în lucrările conferințelor științifice:**
- ✓ **naționale cu participare internațională**
- 13. Racoviță A., Sprincean M., Moșin V., Capcelea S., Hadjiu S., Revenco N. 45,X/46,XY la bărbat cu infertilitate: raport de caz clinic. *Materialele conferinței naționale cu participare internațională Bială Chișinău-Sibiu, ediția V-a: „Managementul interdisciplinar al copilului”*. Chișinău: 2022, p. 145-149. ISBN 978-9975-58-274-2.
- 14. Sprincean, M., Hadjiu, S., Călcîi, C., Lupușor, N., Grîu, C., Feghiu, L., Cuzneț, L., Racoviță, S., Tihai, O., Revenco, N., Groppa, S. Resurse de ameliorare a dezvoltării copiilor cu unele patologii genetice. *Materialele conferinței naționale cu participare internațională Bială Chișinău-Sibiu, ediția V-a: „Managementul interdisciplinar al copilului”*. Chișinău: 2022, p. 51-61.
- 15. Hadjiu, S., Călcîi, C., Lupușor, N., Feghiu, L., Grîu, C., Cuzneț, L., Racoviță, S., Tihai, O., Sprincean, M., Revenco, N. Particularități clinico-diagnostice ale encefalopatiilor mitocondriale. *Materialele Conferinței Chișinău-Sibiu Managementul interdisciplinar al copilului*, 2022, 66-75.
- 16. Mariana S., Hadjiu S., Racovița, Tihai O., Popa C., Dumitraș A., Revenco N., Bioethical aspects in medico-genetic consultation. *Materialele Conferinței Științifice Internaționale, Health, Medicine and Bioethics in contemporary society: inter- and pluridisciplinary studies 5th edition*. Chișinău: 2022, p. 185-191.
- **Rezumate/abstracte/teze**
- ✓ **în lucrările conferințelor internaționale**
- 1. Racoviță S., Moșin V.; Gorduza EV., Hadjiu S., Chesov E., Revenco N., Sprincean M. Aspecte clinico-genetice în infertilitatea masculină. *Volum de rezumate, Școala Medicală de pediatrie*. România Iași, România: 2018, p. 57.
- 2. Racoviță S., Revenco N., Hadjiu S., Moșin V., Barbova N., Halabudenco E., Mișina A., Samoilenko T., Sprincean M. Aspecte clinico-genetice în Sindromul Klinefelter. *Volume LXVII, Supplement Romanian Journal of Pediatrics*. București, România: 2018, p. 130. ISSN 1454-0398.

3. Racoviță S., Moșin V., Gorduza EV., Strătilă M., Halabudenco E., Samoilenco T., Mișina A., Sprincean M. Clinical importance of cytogenetic testing in infertile male. *Supplement Romanian Journal of Rare Diseases, al v-lea Congres de Genetică Medicală cu participare internațională*. Gura Humorului, România: 2018, p 38.
4. Racoviță S., Sprincean M., Halabudenco E., Mișina A., Samoilenco T., Guțuleac R., Chesov E., Revenco N., Moșin V. The cytogenetic study in male infertility. *Materialele Conferinței internaționale, European Human Genetics Conferece*. Milano, Italia: 2018, p. 107.
5. Tihai O., Sprincean M., Hadjiu S., Ețco L., Halabudenco E., Racoviță S., Barbova N., Bejan N., Secieru V., Nour V., Revenco N. Diagnosticul prenatal în sarcina cu risc crescut de malformații congenitale cerebrale. *Volum LXVII, Supplement Romanian Journal of Pediatrics*. București, România: 2018, p. 136. ISSN 1454-0398.
6. Racoviță S., Moșin V., Capcelea S., Cemortan I., Badan L., Boiciuc K., Gorduza EV., Sprincean M. Cytogenetic and Y chromosome microdeletion testing in infertile males. *Supplement Romanian Journal of Rare Diseases*. Timișoara, România: 2019, p. 49.
7. Racoviță S., Capcelea S., Boiciuc K., Moșin V., Revenco N., Hadjiu S., Sprincean M. Clinical and genetic particularities in male infertility. *Supliment la revista de Neurologie și Psihiatrie a Copilului și adolescentului*. România: 2019, p. 81-82. ISSN 2344-3405.
8. Hadjiu S., Sprincean M., Lupușor N., Grîu C., Racoviță S., Cuzneț L., Feghiu L., Egorov V., Calcii C., Revenco N. Caracteristicile clinice ale sindromul Guillain – barre la copii. *Supliment la revista de Neurologie și Psihiatrie a Copilului și adolescentului*. România: 2019, p. 41-42. ISSN 2344-3405.
9. Sprincean M., Hadjiu S., Racoviță S., Burac N., Lupușor N., Grîu C., Cuzneț L., Feghiu L., Egorov V., Calcii C., Revenco N. Aspecte clinico genetice în distrofiile musculare progresive. *Supliment la revista de Neurologie și Psihiatrie a Copilului și adolescentului*. România: 2019, p. 71-72. ISSN 2344-3405.
10. Racoviță S., Moșin V., Sprincean M. Molecular biomarkers of Y chromosome and CFTR gene in infertile males. *Colection of abstracts Biological Markers in Fundamental and Clinical Medicine*. Cehia, Praga: 2019, p. 89. ISN 2570-5911.
11. Racoviță S., Sprincean M. Defects in spermatogenesis of men with Y chromosome microdeletions. *Abstract book of the 8th International Medical Congress for Students and Young Doctors, MedEspera*. Chișinău: 2020, p. 290. ISBN 978-9975-151-11-5.
12. Mironiuc N., Racoviță S. Clinical and cytogenetic variations in male infertility caused by Klinefelter syndrome. *Abstract book of the 8th International Medical Congress for Students and Young Doctors, MedEspera*. Chișinău: 2020, p. 288. ISBN 978-9975-151-11-5.
13. Racovita S., Patrascu A., Capcelea S., Misina A., Samoilenco T., Sprincean M. Cytogenetic study in male infertility associated with azoospermia and severe oligospermia. *Abstract book of the XIth International Congress of Geneticists and Breeders*. Republic of Moldova: 2021, p. 32. ISBN 978-9975-933-56-8. DOI: 10.53040/cga11.2021.015.
14. Sprincean M., Hadjiu S., Racovita S., Burac N., Sacara V., Lupusor N., Griu C., Revenco N. Clinical-genetic particularities of progressive muscular dystrophies in children. *Abstract book of the XIth International Congress of Geneticists and Breeders*. Republic of Moldova: 2021, p. 62, ISBN 978-9975-933-56-8. DOI: 10.53040/cga11.2021.001.
15. Racoviță S., Moșin V., Gorduza EV., Sprincean M. Cytogenetic and Y chromosome microdeletion analysis in infertile males with azoospermia. *Supplement Romanian Journal of Laboratory Medicine*. Tirgu Mureș, România: 2020, p. 56. ISSN 1841-6624. (IF: 0,945)
16. Sprincean M., Hadjiu S., Racoviță S., Halabudenco E., Revenco N. Prenatal diagnosis in pregnancies with high genetic risk. *Supplement Romanian Journal of Laboratory Medicine*. Tirgu Mureș, România: 2020, p. 57. ISSN 1841-6624. (IF: 0,945)
17. Racoviță S., Moșin V., Capcelea S., Boiciuc K., Sprincian M. Molecular genetic method for detecting Y chromosome microdeletions in male infertility. *Publicatia in Catalogue of Posters the 13th Edition of Euroinvent European Exhibition of creativity and inovation*. România: 2021, p. 141.
18. Sprincean M., Hadjiu S., Calcii C., Lupusor N., Racovita S., Griu C., Feghiu L., Cuznet L., Revenco N., Groppa S. Immunoenzymatic expressivity of interleukin-6 in pediatric ischemic stroke. *Supplement of the European Stroke Journal*. 2021, p. 396. DOI: 10.1177/23969873211034932.
19. Racoviță S., Moșin V., Capcela S., Gorduza EV., Sprincean M. Semen quality of male partners of infertile couples in Republic of Moldova. *Supplement Romanian Journal of Laboratory Medicine*. Brașov România: 2022, p. 91-92. ISSN 1841-6624. (IF: 0,945)
20. Racovita S., Sprincian M., Hadjiu S. Neurological impairment and cytogenetic variations in Klinefelter Syndrome. *Abstracts Book of the 8th Congress of the European Academy of Neurology*. Vienna, Austria: 2022, p. 906. ISSN 1468-1331.
21. Racoviță S., Sprincean M., Moșin V., Hadjiu S., Revenco N. Genetic variations in male infertility. *Supliment la revista de Neurologie și Psihiatrie a Copilului și adolescentului*. România: 2022, p. 123. ISSN 2344-3405.
22. Racoviță S., Moșin V., Hadjiu S., Revenco N., Sprincean M. Clinical and cytogenetic polymorphism in Klinefelter Syndrome. *Russian Pediatric Journal: Rusia*, 2022, p. 368. eISSN: 2687-0843
- ✓ în lucrările conferințelor științifice naționale cu participare internațională
23. Racoviță S., Moșin V., Capcelea S., Mișina A., Cemortan I., Sprincean M. Cytogenetic analysis in men with azoospermia. *Abstract book, Congresul consacrat aniversării a 75-a de la fondarea USMF „Nicolae Testemițanu”*. Chișinău: 2020, p. 56.
24. Racoviță S., Moșin V., Hadjiu S., Mișina A., Sprincian M. Aspecte neurogenetice la bărbații infertili cu Sindromul Klinefelter. *Abstract book, Congresul consacrat aniversării a 75-a de la fondarea USMF „Nicolae Testemițanu”*. Chișinău: 2020, p. 550.
25. Racoviță S., Moșin v., Hadjiu S., Revenco N., Calcii C., Cuznet L., Griu C., Feghiu L., Lupusor N., Sprincean M. Neurogenetic aspects in men with Klinefelter’s syndrome. *Neuro Congres Issue, Moldovan Medical Journal*. Chișinău: 2021, p. 55. ISSN 2537-6373.
26. Feghiu L., Hadjiu S., Calcii C., Sprincean M., Lupusor N., Griu C., Cuznet L., Racoviță S., Groppa S. Drug-resistant epilepsies in children: clinical case. *Neuro Congres Issue, Moldovan Medical Journal*. Chișinău: 2021, p. 40. ISSN 2537-6373.
27. Mariana S., Hadjiu S., Lupusor N., Griu C., Cuznet L., Racovita S., Feghiu L., Calcii C., Revenco N., Groppa S. Immunoenzymatic changes in ischemic stroke in children. *Neuro Congres Issue, Moldovan Medical Journal*. Chișinău: 2021, p. 25. ISSN 2537-6373

28. Racoviță S., Moșin V., Capcelea S., Mișina A., Sprincian M., Clinical and genetic study in male infertility with azoospermia. *Abstract book, Conferința Cercetarea în biomedicină și sănătate: calitate, excelență și performanță*. Chișinău: 2021, p. 393. ISBN 978-9975-82-223-7.
 29. Racoviță S., Moșin V., Capcelea S., Sprincean M. Evaluarea clinică și genetică în infertilitatea masculină. Culegere de rezumate, *Conferința Cercetarea în biomedicină și sănătate: calitate, excelență și performanță*. Chișinău: 2022, p. 12.
 30. Racoviță S., Moșin V., Sprincean M. Analysis of Y chromosome microdeletions and CFTR gene mutations as genetic markers in male infertility. *Abstract book, the National Conference with International Participation Life sciences in the dialogue of generations. Chisinau: 2022*, p 139.
- **Brevete de invenții, patente, certificate de înregistrare, materiale la saloanele de invenții**
- ✓ **Brevet de invenții**
 1. Racoviță S., Moșin V., Capcelea S., Boiciuc K., Sprincean M. Metodă molecular-genetică pentru depistarea microdelețiilor cromozomului Y în infertilitatea masculină, Brevet de invenție MD 1489 BI. În: *Buletin oficial de proprietate intelectuală* nr. 1/2021. 31.01.2021, pp. 58-59.
 - ✓ **Certificate de inovator**
 2. Racoviță S., Sprincean M., Moșin V., Capcelea S., Sacara V., Boiciuc C. *Metodă molecular-genetică pentru depistarea mutației genei DBY a cromozomului Y în infertilitatea masculină*. Nr. 473 din 22.06.2020 acordat în conformitate cu art. 16 al Legii nr. 138-XV din 10.05.2001.
 3. Racoviță S., Sprincean M., Moșin V., Capcelea S., Sacara V., Boiciuc C. *Metodă molecular-genetică pentru depistarea mutației genei DYS 209 a cromozomului Y în infertilitatea masculină*. Nr. 474 din 22.06.2020 acordat în conformitate cu art. 16 al Legii nr. 138-XV din 10.05.2001.
 4. Racoviță S., Sprincean M., Moșin V., Capcelea S., Sacara V., Boiciuc C. *Metodă molecular-genetică pentru depistarea mutației genei DYS237 a cromozomului Y în infertilitatea masculină*. Nr. 475 din 22.06.2020 acordat în conformitate cu art. 16 al Legii nr. 138-XV din 10.05.2001.
 5. Racoviță S., Sprincean M., Moșin V., Capcelea S., Sacara V., Boiciuc C. *Metodă molecular-genetică pentru depistarea mutației genei DYS241 a cromozomului Y în infertilitatea masculină*. Nr. 476 din 22.06.2020 acordat în conformitate cu art. 16 al Legii nr. 138-XV din 10.05.2001.
 6. Racoviță S., Sprincean M., Moșin V., Capcelea S., Sacara V., Boiciuc C. *Metodă molecular-genetică pentru depistarea mutației genei RBM1 a cromozomului Y în infertilitatea masculină*. Nr. 477 din 22.06.2020 acordat în conformitate cu art. 16 al Legii nr. 138-XV din 10.05.2001.
 7. Racoviță S., Sprincean M., Moșin V., Capcelea S., Sacara V., Boiciuc C. *Metodă molecular-genetică pentru depistarea mutației genei USP9Y a cromozomului Y în infertilitatea masculină*. Nr. 478 din 22.06.2020 acordat în conformitate cu art. 16 al Legii nr. 138-XV din 10.05.2001.
 8. Racoviță S., Sprincean M., Moșin V., Capcelea S., Sacara V., Boiciuc C. *Metodă molecular-genetică pentru depistarea mutației genei DBY a cromozomului Y în infertilitatea masculină*. Nr. 5770 din 23.06.2020, înregistrat la USMF „Nicolae Testemițanu”.
 9. Racoviță S., Sprincean M., Moșin V., Capcelea S., Sacara V., Boiciuc C. *Metodă molecular-genetică pentru depistarea mutației genei DYS 209 a cromozomului Y în infertilitatea masculină*. Nr. 5771 din 23.06.2020, înregistrat la USMF „Nicolae Testemițanu”.
 10. Racoviță S., Sprincean M., Moșin V., Capcelea S., Sacara V., Boiciuc C. *Metodă molecular-genetică pentru depistarea mutației genei DYS237 a cromozomului Y în infertilitatea masculină*. Nr. 5772 din 23.06.2020, înregistrat la USMF „Nicolae Testemițanu”.
 11. Racoviță S., Sprincean M., Moșin V., Capcelea S., Sacara V., Boiciuc C. *Metodă molecular-genetică pentru depistarea mutației genei DYS241 a cromozomului Y în infertilitatea masculină*. Nr. 5773 din 23.06.2020, înregistrat la USMF „Nicolae Testemițanu”.
 12. Racoviță S., Sprincean M., Moșin V., Capcelea S., Sacara V., Boiciuc C. *Metodă molecular-genetică pentru depistarea mutației genei RBM1 a cromozomului Y în infertilitatea masculină*. Nr. 5774 din 23.06.2020, înregistrat la USMF „Nicolae Testemițanu”.
 13. Racoviță S., Sprincean M., Moșin V., Capcelea S., Sacara V., Boiciuc C. *Metodă molecular-genetică pentru depistarea mutației genei USP9Y a cromozomului Y în infertilitatea masculină*. Nr. 5775 din 23.06.2020, înregistrat la USMF „Nicolae Testemițanu”.
 - ✓ **Acte de implementare**
 1. Racoviță S., Sprincean M., Moșin V., Capcelea S., Sacara V., Boiciuc C. *Metodă molecular-genetică pentru depistarea mutației genei DBY a cromozomului Y în infertilitatea masculină*. Nr. 44 din 22.06.2020.
 2. Racoviță S., Sprincean M., Moșin V., Capcelea S., Sacara V., Boiciuc C. *Metodă molecular-genetică pentru depistarea mutației genei DYS 209 a cromozomului Y în infertilitatea masculină*. Nr. 45 din 22.06.2020.
 3. Racoviță S., Sprincean M., Moșin V., Capcelea S., Sacara V., Boiciuc C. *Metodă molecular-genetică pentru depistarea mutației genei DYS237 a cromozomului Y în infertilitatea masculină*. Nr. 46 din 22. iunie.2020.
 4. Racoviță S., Sprincean M., Moșin V., Capcelea S., Sacara V., Boiciuc C. *Metodă molecular-genetică pentru depistarea mutației genei DYS241 a cromozomului Y în infertilitatea masculină*. Nr. 47 din 22.06.2020.
 5. Racoviță S., Sprincean M., Moșin V., Capcelea S., Sacara V., Boiciuc C. *Metodă molecular-genetică pentru depistarea mutației genei RBM1 a cromozomului Y în infertilitatea masculină*. Nr. 48 din 22.06.2020.
 6. Racoviță S., Sprincean M., Moșin V., Capcelea S., Sacara V., Boiciuc C. *Metodă molecular-genetică pentru depistarea mutației genei USP9Y a cromozomului Y în infertilitatea masculină*. Nr. 49 din 22.06.2020.
 - **Participări cu comunicări la foruri științifice:**
 - ✓ **internaționale**
 1. Racoviță S., Moșin V., Gorduza EV., Hadjiu s., Chesov E., Revenco N., Sprincean M. Aspecte clinico-genetice în infertilitate masculină. *Program Școala Medicală Pediatrică cu participare internațională ediția VI*. Iași, România: 15-17 mai 2018, p. 15.

2. Racoviță S., Moșin V., Gorduza EV., Strătilă M., Halabudenco E., Samoilenko T., Mișina A., Sprincean M. Clinical importance of cytogenetic testing in infertile male. *Program al V-lea Congres de Genetică Medicală cu participare internațională*. Gura Humorului, România: 26-28 septembrie 2018, p. 7.
3. Racoviță S., Capcelea S., Boiciuc K., Moșin V., Revenco N., Hadjiu S., Sprincean M., Particularități clinico-genetice în infertilitatea masculină. *Program al XX-lea Congres SNPCAR Societatea de Neurologie și Psihiatrie a Copilului și Adolescentului*, România: 18-21 septembrie, 2019, p. 23.
4. Racoviță S., Sprincean M. Defects in spermatogenesis of men with y chromosome microdeletions. *MedEspera The 8th International Medical Congress for Students and Young Doctors*. Chisinau, Republic of Moldova: 24-26 septembrie, 2020.
5. Racoviță S. Particularități clinice și variații citogenetice în Sindromul Klinefelter. *Al XXI-lea congres SNPCAR și a 43-a conferință de neurologie - psihiatrie a copilului și adolescentului și profesioniști asociați cu participare internațională*. România: 22-25 septembrie, 2021.
6. Racoviță S., Veaceslav M., Capcela S., Gorduza EV., Sprincean M. Semen quality of male partners of infertile couples in Republic of Moldova. *The 13th National Conference of the Romanian Association of Laboratory Medicine, with international participation*. Brașov, România: 25-27 mai, 2022, p. 13.
7. Racoviță S., Sprincean M., Hadjiu S., Revenco N. Variații genetice în infertilitatea masculină *Al XXII-lea congres SNPCAR și a 44-a conferință de neurologie - psihiatrie a copilului și adolescentului și profesioniști asociați cu participare internațională*. România: 21-24 septembrie 2022, p.12.
8. Racoviță S., Moșin V., Gorduza EV., Sprincean M. Cytogenetic and Y chromosome microdeletion analysis in infertile males with azoospermia. *A –IV Conferință Națională a Asociației de Medicină de Laborator din România cu Participare Internațională*. Tîrgu-Mureș, România: 9-11 septembrie, 2020, p. 15. **Invited speaker**
- ✓ **la conferințe naționale cu participare internațională**
9. Racoviță S., Moșin V., Capcelea S., Ponetenco D., Boiciuc K., Sprincean M. Bărbat 46,XX, raport de caz clinic. *Conferință națională cu participare internațională bienala Chișinău Sibiu, ediția a III-a, interdisciplinaritatea în bolile infecțioase pediatrice*. Chișinău: 16-18 mai 2019, p. 3.
10. Racoviță S., Moșin V., Hadjiu S., Mișina A., Sprincean M. Aspecte neurogenetice în Sindromul Klinefelter. *Congresul consacrat aniversării a 75-a de la fondarea USMF „Nicolae Testemițanu”*. Chișinău: 21-23 octombrie 2020, p. 35.
11. Racoviță S. Neurogenetic aspects in Klinefelter’s syndrome in men. In program: *The 7th congress of the society of neurologists of the Republic of Moldova with international participation*. Chisinau: 16-18 septembrie 2021, p.9.
12. Racoviță S. Particularitățile polimorfismului clinic și variații citogenetice în sindromul Klinefelter. *Conferința Internațională de Pediatrie „Actualități în practica pediatrică: provocări și succese”*. Chișinău: 16 septembrie 2022, p.3.
- ✓ **la conferințe naționale**
13. Racoviță S. Identificarea microdelețiilor în cromozomul Y prin multiplex PCR. *Conferință științifică anuală secțiunea nr.1, Probleme fundamentale ale medicinei USMF Nicolae Testemițanu*. Chișinău: 18 octombrie 2018, p. 7.
14. Racoviță S. Particularități clinico-genetice la bărbații cu azoospermie. *Conferință științifică anuală secțiunea nr.1, Probleme fundamentale ale medicinei USMF Nicolae Testemițanu*. Chișinău: 17 octombrie 2019, p.7.
15. Racoviță S. Evaluarea clinică și genetică în infertilitatea masculină. *Conferință științifică anuală secțiunea nr.1, Morfologie normală și patologică USMF Nicolae Testemițanu*. Chișinău: 20 octombrie 2022, p.2.
- **Postere la conferințe științifice**
- ✓ **cu participare internațională**
1. Racoviță S., Revenco N., Hadjiu S., Moșin V., Barbova N., Halabudenco E., Mișina A., Samoilenko T., Sprincean M. Aspecte clinico-genetice în Sindromul Klinefelter. *Conferința Națională de Pediatrie 2018 – Actualități în Pediatrie*. București, România: 22-24 martie, 2018. P085
2. Racoviță S., Sprincean M.; Halabudenco E., Mișina A., Samoilenko T., Guțuleac R., Chesov E., Revenco N., Moșin V. The cytogenetic study in male infertility. *Conferință internațională, European Human Genetics Conference*. Milano Italia: 16-19 iunie, 2018. E-P01.07
3. Racoviță S., Moșin V., Capcelea S., Cemortan I., Badan L., Boiciuc K., Gorduza EV., Sprincean M. Cytogenetic and Y chromosome microdeletion testing in infertile males. *Conference of the Romanian Society of Medical Genetics*. Timișoara, România: 18-20 septembrie 2019.
4. Racoviță S., Sprincean M. Defects in spermatogenesis of men with Y chromosome microdeletions. *MedEspera The 8th International Medical Congress for Students and Young Doctors*. Chisinau, Republic of Moldova: 24-26 septembrie 2020.
5. Nicoleta Mironiuc, **Racoviță S.** Clinical and cytogenetic variations in male infertility caused by Klinefelter syndrome. *MedEspera The 8th International Medical Congress for Students and Young Doctors*. Chisinau, Republic of Moldova: 24-26 septembrie 2020.
6. Racoviță S., Moșin V., Capcelea S., Boiciuc K., Sprincean M. Molecular genetic method for detecting Y chromosome microdeletions in male infertility. *The 13th Edition of Euroinvent European Exhibition of creativity and innovation*. Iași, România, 22 mai 2021.
7. Racoviță S., Sprincean M., Hadjiu S. Neurological impairment and cytogenetic variations in Klinefelter Syndrome. Congress of the European Academy of Neurology. Viena, Austria: 25-26 iunie 2022. EPV-613
- ✓ **naționale cu participare internațională**
8. Racoviță S., Moșin V., Capcelea S., Ponetenco D., Boiciuc K., Sprincean M. Bărbat 46,XX, Raport de caz clinic. *Conferință națională cu participare internațională Bienala Chișinău Sibiu, ediția a III-a, interdisciplinaritatea în bolile infecțioase pediatrice*. Chișinău: 16-18 mai 2019.
9. Racoviță S., Moșin V., Hadjiu S., Mișina A., Sprincean M. Aspecte neurogenetice în Sindromul Klinefelter. *Congresul consacrat aniversării a 75-a de la fondarea USMF „Nicolae Testemițanu”*. Chișinău: 21-23 octombrie 2020, p. 48.
10. Racoviță S., Moșin V., Capcelea S., Mișina A., Cemortan I., Sprincean M. Investigații citogenetice la bărbații cu azoospermie. *Congresul consacrat aniversării a 75-a de la fondarea USMF „Nicolae Testemițanu”*. Chișinău: 21-23 octombrie 2020, p. 22.
11. Racoviță S., Moșin V., Capcelea S., Mișina A., Sprincean M. Studiu clinico-genetic în infertilitatea masculină cu azoospermie. *Conferinței științifice consacrate aniversării a 76-a de la fondarea USMF „Nicolae Testemițanu”*. Chișinău: 20-22 octombrie 2021, p. 40.