



Recommendations on the diagnosis of male infertility — genetic testing

Katarzyna Jankowska¹, Anna Kutkowska-Kaźmierczak², Wojciech Zgliczyński¹, Andrzej Kochański³,
Jolanta Słowikowska-Hilczler⁴

¹Department of Endocrinology, Bielanski Hospital, Centre of Postgraduate Medical Education, Warsaw, Poland

²Department of Medical Genetics, Institute of the Mother and Child, Warsaw, Poland

³Mossakowski Medical Research Centre, Polish Academy of Sciences, Warsaw, Poland

⁴Department of Andrology and Reproductive Endocrinology, Medical University of Łódź, Łódź, Poland

Abstract

Male infertility is the cause of couples' infertility in about 50% of cases. Current recommendations on the diagnosis and treatment of male infertility advance thorough medical history taking and physical examination, to provide the basis for further genetic evaluation.

The extent of genetic testing itself depends on the semen analysis results, which allow the risk of inheritance of chromosomal aberrations to be determined and the root causes of habitual miscarriages to be explained.

In azoospermia, once the type of microdeletion has been identified, a decision can be made as to whether a testicular biopsy is required to obtain sperm for the artificial reproductive technology (ART) procedure.

The physical examination, genetic interview, and hormonal results are helpful in deciding which genetic tests to perform.

Our research facilitates genetic testing in the diagnosis of male infertility. (*Endokrynol Pol* 2020; 71 (6): 561–566)

Key words: male infertility; genetic counselling; genetic recommendations; semen analysis

Introduction

According to the World Health Organisation (WHO), around 60–80 million couples worldwide are affected by infertility, which is diagnosed after one year of unprotected sex. About 10–15% of couples of childbearing age (approx. 1.5 million couples) experience fertility problems. Unfortunately, the number of couples who are trying to conceive and are unsuccessful is still growing.

Current guidelines for the diagnosis and treatment of infertility have been developed by the European Academy of Andrology (EAA) and the European Association of Urology (EAU), and genetic diagnostics hold a very important place in them [1].

Infertility — prognostic factors

According to these guidelines, the most important single factor determining a couple's fertility is the woman's age. When consulting a man, the age of their partner should be noted in the documentation. The fertility potential of a 38-year-old woman compared to a 25-year-old woman is only 25%.

In addition to the partner's age and fertility status, prognostic factors also include the duration of infertility, the diagnosis of primary or secondary infertility, and semen analysis. Primary infertility is when their partner has never had a pregnancy. Secondary infertility is when a couple already has offspring or has had miscarriages (Tab. 1).

Male infertility diagnosis is based on sperm analysis, and men with infertility usually show oligozoospermia (low sperm count, i.e. < 15 million/mL) or azoospermia (complete absence of sperm) in semen analysis. If the semen analysis results are abnormal, it should be repeated after 2.5 months (the spermatogenesis cycle usually lasts 74 days).

Table 1. Infertility prognostic factors

Infertility prognostic factors	Male factor adverse prognostic effect
Age of woman	> 35 years
Semen analysis	Oligozoospermia (< 15 M/mL of sperm)
Duration of infertility	> 2 years
Primary/secondary infertility	Primary



Diagnostic evaluation of a man with infertility

The following should be carried out in men with infertility:

- patient interview;
- physical examination;
- semen analysis;
- scrotal ultrasound;
- hormonal tests;
- genetic counselling.

Interview with a man with infertility

The interview should take into account the following: the age and fertility status of their partner, the duration of infertility, fathering children in one or more relationship/s, the frequency of intercourse, erectile dysfunction or premature ejaculation, medications being taken, illnesses (including surgery), and stimulants (cigarettes, alcohol, and drugs).

Genetic interview

From the point of view of the genetic consultation, information such as:

- the pedigree analysis or family history of diseases;
- the patient's age as a future father and the age of his partner;
- the occurrence of cryptorchidism (testicular descent requires an adequate concentration of hormones in utero: testosterone, dihydrotestosterone, and growth hormone);
- pelvic or genital surgery (which may also indicate a history of genital correction in childhood);
- sexual maturation (premature, delayed);
- the occurrence of neonatal deaths in the family (due to possible chromosomal aberration or in the case of unrecognised congenital adrenal hyperplasia — a common genetic condition inherited in an autosomal recessive manner);
- the presence of intellectual disability with or without congenital defects in the family (possible chromosomal aberration in family member and a balanced chromosomal translocation in our patient);
- the presence of male infertility in family (possible monogenic cause of infertility in family);
- the occupational load (exposure to pesticides and other chemicals).

The age of the man (future father)

The importance of a man's age as the father of a child is increasingly pointed out [2, 3]. Until recently, attention was mainly focused on the woman's age, where the age of over 35 years is treated in genetics as an independent risk factor increasing the likeli-

hood of defects in a child caused by chromosomal aberrations.

Numerous studies have recently appeared showing the importance of a man's age as a child's father. The increasing number of older man/younger woman couples allows us to conclude that older age of the father increases the risk of certain diseases in the offspring, such as achondroplasia, Apert, Noonan, and Costello syndromes. Goriely and Wilkie in 2012 described paternal age effects (PAE) disorders, caused by *de novo* autosomal dominant mutations in *FGFR2*, *FGFR3*, *RET*, *PTPN11*, *HRAS*, and *KRAS* genes and recently identified the link between mutations in six newly associated genes: *BRAF*, *CBL*, *MAP2K1*, *MAP2K2*, *RAF1*, and *SOS1*, dysregulating the RAS-MAPK pathway and selfish spermatogonial selection [4]. This term describes the phenomenon of spontaneously arising mutations in spermatogonia leading to clonal expansion that results in elevated mutation levels in sperm. They showed that such deleterious mutations have a repository in the aging male germline [5].

It has also been demonstrated that advanced paternal age (the age of over 45 years in men) predisposes to a more frequent occurrence of autism and schizophrenia in a child [6–11].

Cryptorchidism is the most common congenital malformation of the male genitalia. It is estimated that about 1% of 1-year-old children have cryptorchidism, which is currently considered as a part of testicular dysgenesis syndrome (TDS). This means that testicular failure results from a gonadal development disorder caused by environmental and/or genetic factors in early pregnancy.

Cryptorchidism is, therefore, a key symptom. At present, early orchidopexy (i.e. surgery to move an undescended testicle into the scrotum) is recommended, usually at around 6–18 months of age. The increased temperature in the abdomen causes irreversible damage to the testicles.

It has been proven that germ cell degeneration occurs in undescended testes in the first year of life. In the second year of life, the number of germ cells already decreases. In bilateral cryptorchidism, the chances of paternity decrease to 35–53%, while in unilateral cryptorchidism, paternity rates are reduced by 11%. Cryptorchidism may be accompanied by hypospadias, reduced fertility, Leydig cell dysfunction, and an increased risk of testicular germ cell tumour.

The physical examination

The physical examination of a male patient with infertility may lead to a diagnosis of eunuchoid body proportions and low testicular volume, which may be indicative of Klinefelter syndrome. Poor development

of some secondary male characteristics may point to partial androgen insensitivity syndrome (PAIS). Café-au-lait spots or patches may be a symptom of congenital developmental disorders. A diminished or absent sense of smell may suggest Kallmann syndrome. Gynaecomastia is often a symptom of hypogonadism.

Semen analysis

Currently applicable standards for semen analysis (WHO 2010) are presented in Table 2.

Oligozoospermia, which is a low sperm count of less than 15 million per millilitre and/or less than 39 million sperm per ejaculate, is common among men with infertility problems. Oligoasthenoatozoospermia (OAT) is a condition in which there is an abnormally low sperm count, poor sperm motility, and significant abnormalities in sperm morphology.

Genetic testing in infertile men

The guidelines recommend the use of specific assays to identify the presence of genetically determined disorders in all couples with genetic abnormalities found in clinical or genetic testing and whenever there is an increased risk of genetic disease due to a positive family history (Tab. 3).

Table 2. Lower reference limits (5th centiles, 95% CIs) for semen characteristics

Parameter	Lower reference limit (range)
Semen volume (mL)	1.5 (1.4–1.7)
Total sperm count (10 ⁶ /ejaculate)	39 (33–46)
Sperm concentration (10 ⁶ /mL)	15 (12–16)
Total motility (PR + NP)	40 (38–42)
Progressive motility (PR, %)	32 (31–34)
Vitality (live spermatozoa, %)	58 (55–63)
Sperm morphology (normal forms, %)	4 (3.0–4.0)

CI — confidence interval; MAR — mixed antiglobulin reaction; NP — non-progressive; PR — progressive

Table 3. Indications for genetic testing in men with infertility

Indication	Tests
Aggravated anamnesis/physical examination	Karyotype
Sperm count < 10 million/mL	Karyotype
Azoospermia (total absence of sperm)	Karyotype, AZF, CFTR
CFTR mutation in partner	CFTR

AZF — azoospermia factor; CFTR — the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator gene

Karyotype

The guidelines suggest karyotyping men with infertility in the following clinical situations:

- a positive history and/or physical examination;
- a sperm count of less than 10 million/mL in semen analysis;
- azoospermia (absence of sperm in the ejaculate) in semen analysis.

The most common genetic defect found in men with infertility is Klinefelter syndrome (47, XXY). Hormone assays usually show hypergonadotropic hypogonadism, which is associated with low levels of testosterone and elevated levels of follicle-stimulating hormone (FSH) and luteinising hormone (LH). However, in many patients, testosterone levels may be at the lower limit of normal or even in the middle of the normal range. It is not always easy to diagnose Klinefelter syndrome because it turns out that levels of FSH are not always greatly elevated. In some patients with FSH gene polymorphism, FSH levels may be moderately elevated. Hence, analysis of FSH gene polymorphism has recently been included as a recommendation for some cases. It has been demonstrated that some FSH receptor gene polymorphisms are associated with an unfavourable prognostic condition for testicular biopsy sperm retrieval.

In cytogenetic testing of testicular biopsies in patients with azoospermia, which has been performed to collect sperm for artificial reproductive technology (ART) procedures, some patients show mosaic patterns in which the karyotype analysis of peripheral blood leukocytes is normal, while the karyotype analysis of cells obtained from testicular biopsies indicated Klinefelter syndrome.

Long-term endocrine follow-up and androgen replacement therapy is recommended, where necessary, in all patients diagnosed with Klinefelter syndrome.

The cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (CFTR)

Indications for determining CFTR gene mutation:

- azoospermia;
- structural abnormalities of the vas deferens (unilateral or bilateral absence);
- CFTR mutation in partner.

If a mutation is detected in a patient, the presence of a CFTR gene mutation should be excluded in their partner.

Azoospermia factor (AZF)

Azoospermia factor microdeletions should be performed on every patient with azoospermia, where azoospermia should be found in 2 semen tests every 1–3 months.

There is no need to determine microdeletion in men with obstructive azoospermia (i.e. caused by an obstruction of the genital tract) if intracytoplasmic sperm injection (ICSI) is planned, because their spermatogenesis should be normal, thus excluding AZF.

It is important to distinguish between obstructive azoospermia and non-obstructive azoospermia because the finding or suspicion of ejaculatory duct obstruction rules out the necessity of determining AZF microdeletion.

Obstructive azoospermia (OA) is less common and occurs in 15–20% of men with azoospermia. Obstructive azoospermia is characterised by:

- the absence of spermatozoa and spermatogenic cells in the semen and post-ejaculatory urine (caused by an obstruction);
- a low semen volume of less than 1.5 mL;
- normal levels of FSH;
- normal testicular volume in ultrasound (greater than 15 mL);
- epididymal enlargement;
- at times, the congenital bilateral absence of the vas deferens (CBAVD), where an obstruction at the epididymis level is more common.

The prevailing cause of OA is epididymal obstruction, which affects 30–67% of men with azoospermia. It can manifest itself as CBAVD when the ducts that carry sperm away from the testes and towards the penis fail to develop, which is associated with 82% of *CFTR* gene mutations. It may sometimes result from Young's syndrome, involving congenital epididymal obstruction, as well as chronic sinus and respiratory tract infections. Obstruction can also be acquired, which is usually secondary to an acute infection (gonococci) or a subclinical infection (chlamydia); trauma and post-operative occlusion are less common causes.

The only therapeutic option for patients with non-obstructive azoospermia (NOA), who have spermatozoa in their testicular biopsy, is intracytoplasmic sperm injection (ICSI) using fresh or cryopreserved spermatozoa. Spermatozoa are retrieved using the testicular sperm extraction (TESE) procedure in about 50% of patients with NOA.

The likelihood of sperm retrieval in patients with complete AZFa and AZFb microdeletions is virtually zero, which is why TESE procedures are, in this case, contraindicated.

Male patients with Yq microdeletions (and their partners) who are planning ICSI should be informed that microdeletions (mainly AZFc) may be passed on to their male, but not to their female, offspring.

The WES, WGS analysis

To date, numerous reports have provided evidence of the usefulness of whole exome/genome sequencing

in diagnosing male infertility. These techniques have led to the identification of many causal or supposedly causal genetic defects as mutation in *ADGRG2*, *TEX11*, *MCM8*, *MEIOB*, *MEI1*, *DMC1*, *DNAH6*, *MAGEB4*, *NPAS2*, *PSMC3IP*, *SPINK2*, *STX2*, *SYCE1*, *TAF4B*, *TDRD7*, *TDRD9*, *TEX14*, *TEX15*, *XRCC2*, *ZMYND15*, and others connected with male infertility [12–14]. Recently Lu et al., by X-chromosome whole exome sequencing (WES), demonstrated the evidence of *BCORL1* role in spermatogenesis [15].

Algorithm of genetic diagnostics is presented in Figure 1.

Genetic counselling regarding procedures offered to men wanting to father a child

Parental knowledge on the factors affecting a child's health is increasing. The birth of a healthy child is also determined by the health of their father. Preconception health recommendations for men include the following:

1. Leading a healthy lifestyle. Men should be aware of the risks of sperm DNA damage and avoid factors that could contribute to it [16]. This involves:
 - not smoking cigarettes. It has been shown that cigarette smoking not only has a negative effect on sperm morphology but also leads to sperm DNA damage. Children of smoking fathers have a higher risk of birth defects;
 - limiting caffeine consumption. It has been demonstrated that a large daily coffee intake of more than 450 mg/d causes increased sperm aneuploidy frequency;
 - reducing alcohol intake. Less than 8 units per week has no effect on male fertility, but more than 20 units has adverse effects on sperm quality;
 - refraining from taking medication that can adversely affect spermatogenesis and cause sperm DNA damage;
 - the recommendation of semen cryopreservation for men scheduled to receive chemotherapy or radiation therapy;
 - keeping fit and healthy and within a healthy weight range (normal body mass index [BMI]: 20–25 kg/m²) [16]. For example, obese men with a waist circumference greater than 94 cm have been shown to have sperm counts down by more than 50%, with a higher incidence of sperm aneuploidy. However, Bandel et al. revealed no association between BMI and sperm DNA integrity [17]. Deep-fat frying was considered a separate risk factor for sperm damage;
 - avoiding overheating the testicles;
 - avoid exposure to phthalates and other chemicals in plastics (cosmetics);
 - mobile phones. There are many studies on the effect of cell phone use on male fertility although it is dif-

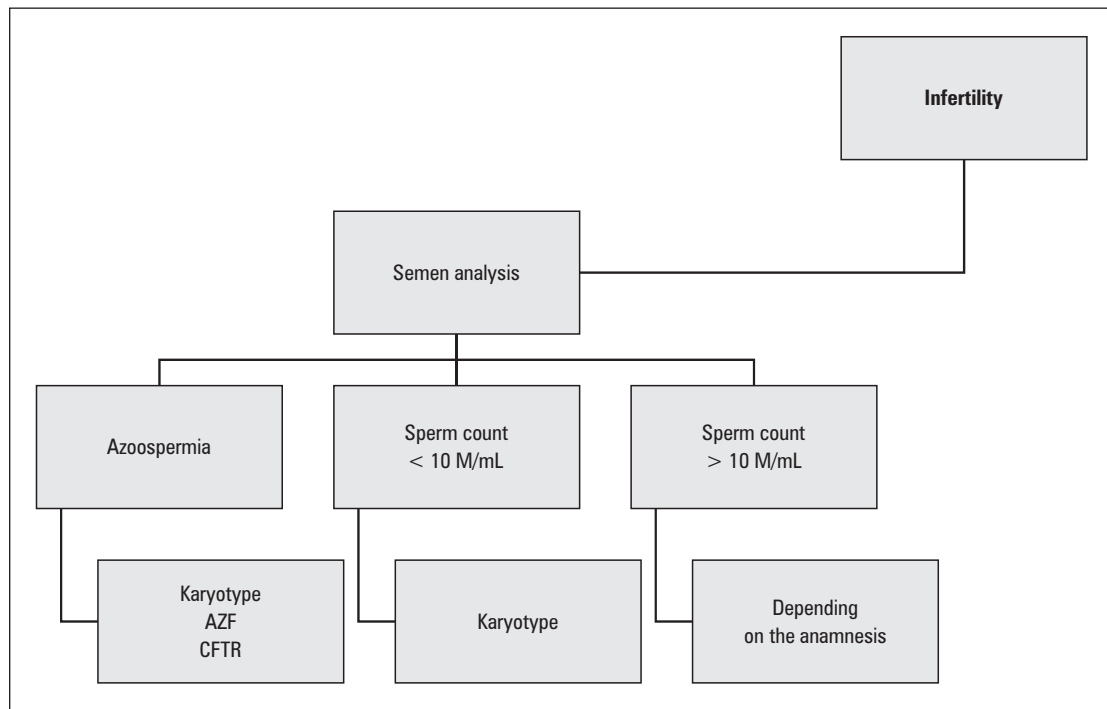


Figure 1. Algorithm of genetic diagnostics in male infertility

difficult to document its direct impact on DNA damage to sperm. The official guidelines state: “Impact on sperm unconfirmed”;

- prevention and treatment of urogenital infections, which are a fairly common cause of infertility and miscarriages in their partner. They are often asymptomatic, with the only sign being an abnormal sperm test. A semen culture test is required to reveal an infection. *Ureaplasma urealyticum*, *Mycoplasma hominis*, *Chlamydia trachomatis*, and *Neisseria gonorrhoeae* are all considered common pathogens causing infertility;
 - taking vitamins and supplements. It has been demonstrated, for instance, that the combination of vitamin C and E are the most effective antioxidants in reducing DNA fragmentation, but the last large-scale trials findings do not support the use of folic acid and zinc supplementation by male partners in the treatment of infertility [18–20].
2. Not delaying fatherhood. The higher the paternal age, the greater the risk of offspring having certain disorders (e.g. autism and schizophrenia).
 3. A genetic consultation at the stage of planning fatherhood in the event of any deviations found during andrological diagnostics.

Conclusions

There is an increasing body of research on the impact of a man’s health as a father on the health of their child.

In order for a healthy embryo (a healthy child) to arise, the health of the future father must first be checked. A clear connection has been demonstrated between fathers with a high percentage of damaged sperm in the DNA fragmentation index (DFI) and a higher incidence of miscarriages and higher percentage of birth defects. Finding the cause of this damage and removing the causes increases the likelihood of having a healthy baby. This also applies to assisted reproduction methods (ART).

Spreading knowledge among physicians and raising awareness among patients about environmental factors having a detrimental effect on fertility is key.

Genetic diagnostics and counselling can contribute to improving the health of children in society.

Conflict of interest

The authors declare that they have no conflict of interest.

Funding

No funding.

Ethical approval

This article does not contain any studies with human participants or animals performed by any of the authors.

References

- Jungwirth A, Diemer T, Dohle GR, Giwercman A, Kopa Z, Krausz C, Tournaye H. Guidelines on Male Infertility. European Association of Urology 2018.
- Brandt JS, Cruz Ithier MA, Rosen T, et al. Advanced paternal age, infertility, and reproductive risks: A review of the literature. *Prenat Diagn*. 2019; 39(2): 81–87, doi: [10.1002/pd.5402](https://doi.org/10.1002/pd.5402), indexed in Pubmed: 30520056.
- Jonge CDe. Paternal age and sperm methylation status. *Fertil Steril*. 2013; 100(4): 940–941, doi: [10.1016/j.fertnstert.2013.06.024](https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2013.06.024), indexed in Pubmed: 3830107.
- Goriely A, Wilkie AOM. Paternal age effect mutations and selfish spermatogonial selection: causes and consequences for human disease. *Am J Hum Genet*. 2012; 90(2): 175–200, doi: [10.1016/j.ajhg.2011.12.017](https://doi.org/10.1016/j.ajhg.2011.12.017), indexed in Pubmed: 22325359.
- Maher GJ, Ralph HK, Ding Z, et al. Selfish mutations dysregulating RAS-MAPK signaling are pervasive in aged human testes. *Genome Res*. 2018; 28(12): 1779–1790, doi: [10.1101/gr.239186.118](https://doi.org/10.1101/gr.239186.118), indexed in Pubmed: 30355600.
- Frans EM, Sandin S, Reichenberg A, et al. Autism risk across generations: a population-based study of advancing grandpaternal and paternal age. *JAMA Psychiatry*. 2013; 70(5): 516–521, doi: [10.1001/jamapsychiatry.2013.1180](https://doi.org/10.1001/jamapsychiatry.2013.1180), indexed in Pubmed: 23553111.
- Breuss MW, Antaki D, George RD, et al. Autism risk in offspring can be assessed through quantification of male sperm mosaicism. *Nat Med*. 2020; 26(1): 143–150, doi: [10.1038/s41591-019-0711-0](https://doi.org/10.1038/s41591-019-0711-0), indexed in Pubmed: 31873310.
- de Kluiver H, Buizer-Voskamp JE, Dolan CV, et al. Paternal age and psychiatric disorders: A review. *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet*. 2017; 174(3): 202–213, doi: [10.1002/ajmg.b.32508](https://doi.org/10.1002/ajmg.b.32508), indexed in Pubmed: 27770494.
- Janecka M, Mill J, Basson MA, et al. Advanced paternal age effects in neurodevelopmental disorders-review of potential underlying mechanisms. *Transl Psychiatry*. 2017; 7(1): e1019, doi: [10.1038/tp.2016.294](https://doi.org/10.1038/tp.2016.294), indexed in Pubmed: 28140401.
- McGrath JJ, Petersen L, Agerbo E, et al. A comprehensive assessment of parental age and psychiatric disorders. *JAMA Psychiatry*. 2014; 71(3): 301–309, doi: [10.1001/jamapsychiatry.2013.4081](https://doi.org/10.1001/jamapsychiatry.2013.4081), indexed in Pubmed: 24452535.
- Gao Yu, Yu Y, Xiao J, et al. Association of Grandparental and Parental Age at Childbirth With Autism Spectrum Disorder in Children. *JAMA Netw Open*. 2020; 3(4): e202868, doi: [10.1001/jamanetworkopen.2020.2868](https://doi.org/10.1001/jamanetworkopen.2020.2868), indexed in Pubmed: 32293683.
- Ghieh E, Mitchell V, Mandon-Pepin B, et al. Genetic defects in human azoospermia. *Basic Clin Androl*. 2019; 29: 4, doi: [10.1186/s12610-019-0086-6](https://doi.org/10.1186/s12610-019-0086-6), indexed in Pubmed: 31024732.
- Pashaei M, Rahimi Bidgoli MM, Zare-Abdollahi D, et al. The second mutation of SYCE1 gene associated with autosomal recessive non-obstructive azoospermia. *J Assist Reprod Genet*. 2020; 37(2): 451–458, doi: [10.1007/s10815-019-01660-1](https://doi.org/10.1007/s10815-019-01660-1), indexed in Pubmed: 31916078.
- Wang Y, Tu C, Nie H, et al. Novel DNAAF6 variants identified by whole-exome sequencing cause male infertility and primary ciliary dyskinesia. *J Assist Reprod Genet*. 2020; 37(4): 811–820, doi: [10.1007/s10815-020-01735-4](https://doi.org/10.1007/s10815-020-01735-4), indexed in Pubmed: 32170493.
- Lu C, Zhang Y, Qin Y, et al. Human X chromosome exome sequencing identifies as contributor to spermatogenesis. *J Med Genet*. 2020 [Epub ahead of print], doi: [10.1136/jmedgenet-2019-106598](https://doi.org/10.1136/jmedgenet-2019-106598), indexed in Pubmed: 32376790.
- Shi X, Chan CP, Waters T, et al. Lifestyle and demographic factors associated with human semen quality and sperm function. *Syst Biol Reprod Med*. 2018; 64(5): 358–367, doi: [10.1080/19396368.2018.1491074](https://doi.org/10.1080/19396368.2018.1491074), indexed in Pubmed: 30033774.
- Bandel J, Bungum M, Richtoff J, et al. No association between body mass index and sperm DNA integrity. *Hum Reprod*. 2015; 30(7): 1704–1713, doi: [10.1093/humrep/dev111](https://doi.org/10.1093/humrep/dev111), indexed in Pubmed: 25994665.
- Greco E, Iacobelli M, Rienzi L, et al. Reduction of the incidence of sperm DNA fragmentation by oral antioxidant treatment. *J Androl*. 2005; 26(3): 349–353, doi: [10.2164/jandrol.04146](https://doi.org/10.2164/jandrol.04146), indexed in Pubmed: 15867002.
- Nowicka-Bauer K, Nixon B. Molecular Changes Induced by Oxidative Stress that Impair Human Sperm Motility. *Antioxidants (Basel)*. 2020; 9(2), doi: [10.3390/antiox9020134](https://doi.org/10.3390/antiox9020134), indexed in Pubmed: 32033035.
- Schisterman EF, Sjaarda LA, Clemons T, et al. Effect of Folic Acid and Zinc Supplementation in Men on Semen Quality and Live Birth Among Couples Undergoing Infertility Treatment: A Randomized Clinical Trial. *JAMA*. 2020; 323(1): 35–48, doi: [10.1001/jama.2019.18714](https://doi.org/10.1001/jama.2019.18714), indexed in Pubmed: 31910279.



Rekomendacje dotyczące diagnostyki genetycznej w niepłodności męskiej

Katarzyna Jankowska¹, Anna Kutkowska-Kaźmierczak², Wojciech Zgliczyński¹, Andrzej Kochański³, Jolanta Słowikowska-Hilczer⁴

¹Klinika Endokrynologii, Szpital Bielański, Centrum Medyczne Kształcenia Podyplomowego, Warszawa

²Zakład Genetyki Medycznej, Instytut Matki i Dziecka, Warszawa

³Katedra Andrologii i Endokrynologii Płodności, Uniwersytet Medyczny w Łodzi

⁴Instytut Medycyny Doświadczalnej i Klinicznej im. M. Mossakowskiego Polskiej Akademii Nauk w Warszawie

Artykuł jest tłumaczeniem pracy: Katarzyna Jankowska, Anna Kutkowska-Kaźmierczak, Wojciech Zgliczyński, Andrzej Kochański, Jolanta Słowikowska-Hilczer. *Recommendations on the diagnosis of male infertility — genetic testing*. Endokrynol Pol 2020; 71 (6): 561–566.

Należy cytować wersję pierwotną. Piśmiennictwo dostępne w wersji pierwotnej na stronach 566.

Streszczenie

Niepłodność męska jest przyczyną niepłodności par w około 50% przypadków. Zakres badań genetycznych zależy przede wszystkim od wyniku badania nasienia (seminogramu). Pozwala on na określenie ryzyka wystąpienia aberracji chromosomowych u potomstwa oraz często wyjaśnienie przyczyn poronień nawykowych.

U osób z azoospermia (brak plemników w nasieniu) badania genetyczne pozwalają wyodrębnić grupę pacjentów, którzy mogą odnieść korzyści z biopsji jąder (tzn. mających szansę na znalezienie plemników w biopsjach jąder w warunkach sali operacyjnej).

Aktualne zalecenia dotyczące diagnostyki i leczenia niepłodności męskiej przedstawiają dokładnie sposób przeprowadzania wywiadu lekarskiego, badania przedmiotowego i diagnostyki obrazowej, będących podstawą do oceny genetycznej.

Znajomość rekomendacji andrologicznych pozwala na podjęcie decyzji dotyczących zakresu diagnostyki genetycznej. (Endokrynol Pol 2020; 71 (6): 567–572)

Słowa kluczowe: niepłodność męska; ocena genetyczna; badanie nasienia; rekomendacje genetyczne

Wprowadzenie

Według danych Światowej Organizacji Zdrowia (WHO, *World Health Organization*) około 60–80 mln par na świecie dotkniętych jest problemem niepłodności. Niepłodność u pary rozpoznaje się po roku współżycia bez zabezpieczenia. Problem niepłodności dotyczy 10–15% par w wieku rozrodczym (ok. 1,5 mln par). Niestety, ciągle rośnie liczba par, które nie mogą doczekać się potomstwa. U około 50% par przyczyną niepłodności jest tak zwany czynnik męski.

Aktualne rekomendacje dotyczące diagnostyki i leczenia niepłodności zostały opracowane przez Europejską Akademię Andrologii (EAA, *European Academy of Andrology*) i Europejskie Towarzystwo Urologiczne (EAU, *European Association of Urology*). Diagnostyka genetyczna zajmuje w tych zaleceniach bardzo ważne miejsce [1].

Niepłodność — czynniki prognostyczne

Według rekomendacji EAA i EAU najważniejszym, pojedynczym czynnikiem warunkującym płodność pary jest wiek kobiety. Konsultując mężczyznę, należy odnotować w dokumentacji wiek partnerki, pamiętając przy tym, że potencjał płodności kobiety 38-letniej w porównaniu z kobietą 25-letnią wynosi zaledwie 25%.

Oprócz wieku partnerki i stanu jej płodności do czynników prognostycznych należą również: czas trwania niepłodności, rozpoznanie niepłodności pierwotnej czy wtórnej oraz wynik badania nasienia. O niepłodności pierwotnej mówi się, jeśli partnerka nigdy nie była w ciąży. Niepłodność wtórna dotyczy sytuacji, kiedy para ma już potomstwo i partnerka nie może zajść w ciążę lub każda kolejna ciąża kończy się poronieniem (tab. 1).



Tabela 1. Czynniki prognostyczne niepłodności

Czynnik prognostyczny	Niekorzystne rokowanie
Wiek kobiety	> 35 lat
Badanie nasienia	Oligozoospermia (< 15 mln plemników/ml)
Czas trwania niepłodności	> 2 lata
Niepłodność pierwotna/wtórna	Pierwotna

Rozpoznanie niepłodności męskiej opiera się na badaniu nasienia, u mężczyzny z niepłodnością zwykle stwierdza się oligozoospermie (małą liczbę plemników, tj. < 15 mln/ml) lub azoospermie (całkowity brak plemników). Jeśli wyniki analizy nasienia są nieprawidłowe, należy je powtórzyć po okresie 2,5 miesiąca (cykl spermatogenezy trwa ok. 74 dni).

Ocena diagnostyczna mężczyzny z niepłodnością

U mężczyzny z niepłodnością zaleca się przeprowadzić:

- wywiad z pacjentem;
- badanie przedmiotowe;
- badanie nasienia;
- USG moszny;
- badania hormonalne;
- badania genetyczne.

Wywiad z pacjentem

W wywiadzie należy uwzględnić: wiek i stan płodności partnerki, czas trwania niepłodności, ojcostwo w innych związkach, częstotliwość współżycia, zaburzenia erekcji lub przedwczesny wytrysk, przyjmowane leki, choroby (w tym zabiegi chirurgiczne), stosowane używki (papierosy, alkohol, narkotyki).

Wywiad genetyczny

Z perspektywy konsultacji genetycznej istotne są informacje, takie jak:

- analiza rodowodu lub rodzinna historia chorób;
- wiek pacjenta jako przyszłego ojca i wiek jego partnerki;
- występowanie wnetrostwa (proces zstępowania jąder wymaga odpowiedniego stężenia hormonów już w czasie życia płodowego: testosteronu, dihydrotestosteronu oraz hormonu wzrostu);
- przebyte operacje w obrębie miednicy lub narządów płciowych (może to również wskazywać na przebytą korekcję narządów płciowych w dzieciństwie);
- przebieg dojrzewania płciowego (przedwczesne, opóźnione);
- występowanie zgonów noworodków w rodzinie (z powodu możliwej aberracji chromosomowej lub

- w przypadku nierozpoznanego wrodzonego przerostu kory nadnerczy — schorzenia genetycznego dziedzicznego autosomalnie recesywnie);
- obecność niepełnosprawności intelektualnej z wrodzonymi wadami lub bez wad w rodzinie (możliwa aberracja chromosomowa u członka rodziny i zrównoważona translokacja chromosomowa u danego pacjenta);
- występowanie niepłodności męskiej w rodzinie (możliwa monogenowa przyczyna niepłodności w rodzinie);
- obciążenie zawodowe (narażenie na pestycydy i inne chemikalia).

Wiek mężczyzny (przyszłego ojca)

Coraz częściej podkreśla się znaczenie wieku mężczyzny jako ojca dziecka [2, 3]. Do niedawna uwaga badaczy skupiała się głównie na kobiecie — wiek powyżej 35. roku życia traktowany jest w genetyce jako niezależny czynnik ryzyka zwiększający prawdopodobieństwo wystąpienia wad wrodzonych i niepełnosprawności intelektualnej u dziecka spowodowanych aberracjami chromosomowymi.

Ostatnio pojawiło się wiele badań wskazujących na znaczenie wieku mężczyzny jako ojca dziecka. Coraz większa liczba par starszy mężczyzna/młodsza kobieta pozwala wnioskować, że starszy wiek ojca zwiększa ryzyko niektórych chorób u potomstwa, takich jak achondroplazja, zespół Aperta, zespół Noonan i zespół Costello. Goriely i Wilkie w 2012 r. opisali zaburzenia określane jako ojcowskie skutki wieku (PAE, *paternal age effects*), wywołane przez mutacje *de novo* autosomalne dominujące w genach *FGFR2*, *FGFR3*, *RET*, *PTPN11*, *HRAS* i *KRAS*, a ostatnio zidentyfikowali związek między mutacjami w sześciu kolejnych genach *BRAF*, *CBL*, *MAP2K1*, *MAP2K2*, *RAF1* i *SOS1*, które rozregulowują szlak RAS-MAPK i selekcję spermatogonialną [4]. Termin ten opisuje zjawisko spontanicznie powstających mutacji w spermatogoniach prowadzących do ekspansji klonalnej, co skutkuje podwyższonym poziomem mutacji w plemnikach. Wykazano, że takie szkodliwe mutacje mają swoje repozytorium w starzejącej się męskiej linii zarodkowej [5]. Stwierdzono także, że bardziej zaawansowany wiek ojcowski (> 45. roku życia mężczyzny) predysponuje do częstszego występowania autyzmu i schizofrenii u dziecka [6–11].

Wnetrostwo

Wnetrostwo, czyli niezstąpienie jąder, to najczęstsza wrodzona wada rozwojowa męskich narządów płciowych. Szacuje się, że około 1% dzieci w wieku 12 miesięcy ma wnetrostwo, które jest obecnie uważane za część zespołu dysgenезji jąder (TDS, *testicular dysgenesis syndrome*). Oznacza to, że niewydolność jąder

jest skutkiem zaburzenia rozwoju gonad wywołanego czynnikami środowiskowymi i/lub genetycznymi we wczesnej ciąży.

Wnętrostwo lub przebycie operacji wnątrostwa jest ważnym czynnikiem potencjalnej niepłodności. Obecnie zaleca się przeprowadzanie wczesnej orchidopeksji. Operacja przeniesienia niezstąpionego jądra do worka mosznowego powinna odbyć się około 6.–18. miesiąca życia. Temperatura w jamie brzusznej jest wyższa niż w worku mosznowym, co powoduje nieodwracalne uszkodzenie jąder. Udowodniono, że już w pierwszym roku życia dziecka w niezstąpionych jądrach następuje zwyrodnienie komórek zarodkowych, zaś w drugim roku życia zmniejsza się ich liczba. W przypadku obustronnego wnątrostwa szanse na ojcostwo obniżają się do 35–53%, natomiast gdy wnątrostwo jest jednostronne — o 11%. Wnątrostwu mogą towarzyszyć: spodziewstwo, zmniejszona płodność, dysfunkcja komórek Leydiga oraz zwiększone ryzyko wystąpienia guza zarodkowego jądra.

Badanie przedmiotowe

Badanie przedmiotowe mężczyzny z niepłodnością może prowadzić do rozpoznania eunuchoidalnych proporcji ciała i małej objętości jąder, co może wskazywać na zespół Klinefeltera. Słaby rozwój niektórych drugorzędowych cech męskich może wskazywać na zespół częściowej niewrażliwości na androgeny (PAIS, *partial androgen insensitivity syndrome*). Plamy typu *café-au-lait* są objawem występującym w wielu chorobach genetycznych. Osłabiony zmysł węchu lub jego brak może sugerować zespół Kallmanna. Ginekomastia jest często objawem hipogonadyzmu.

Badanie nasienia

Obecnie obowiązujące normy badania nasienia (WHO 2010) przedstawiono w tabeli 2.

U mężczyzn z niepłodnością często występuje oligozoospermia, czyli zbyt mała liczba plemników (tzn. < 15 mln/ml i/lub < 39 mln/ejakulat). Często także stwierdza się oligoastenoteratozoospermię (OAT, *oligoasthenoteratozoospermia*), czyli stan, w którym występuje zbyt mała liczba plemników, ich ruchliwość jest niedostateczna oraz zbyt mało jest plemników o prawidłowej morfologii.

Badania genetyczne u mężczyzny z niepłodnością

Rekomendacje zalecają stosowanie określonych badań w celu wykrycia obecności zaburzeń uwarunkowanych genetycznie u wszystkich par z nieprawidłowościami genetycznymi stwierdzonymi w badaniach klinicznych lub genetycznych oraz wszędzie tam, gdzie istnieje zwiększone ryzyko choroby genetycznej z powodu pozytywnego wywiadu rodzinnego (tab. 3).

Tabela 2. Dolna granica normy (5. centyl, 95-procentowy przedział ufności) w badaniu nasienia

Parametr	Dolna granica normy (zakres dolnej granicy normy)
Objętość nasienia [ml]	1,5 (1,4–1,7)
Liczba plemników w ejakulacie [10 ⁶ /ejakulat]	39 (33–46)
Liczba plemników w ml [10 ⁶ /ml]	15 (12–16)
Ruchliwość całkowita (PR + NP)	40 (38–42)
Ruch postępowy (PR, %)	32 (31–34)
Żywotność (% plemników żywych)	58 (55–63)
Morfologia plemników (% plemników o prawidłowej budowie)	4 (3,0–4,0)

NP — ruch nieprogressywny; PR — ruch progressywny

Tabela 3. Wskazania do badań genetycznych u mężczyzny z niepłodnością

Wskazanie	Test
Obciążający wywiad/badanie fizykalne	Kariotyp
Liczba plemników < 10 mln/ml	Kariotyp
Azoospermia (brak plemników w nasieniu)	Kariotyp, AZF, <i>CFTR</i>
<i>CFTR</i> mutacja u partnerki	<i>CFTR</i>

Kariotyp

Wytyczne sugerują określenie kariotypu u mężczyzny z niepłodnością w następujących sytuacjach klinicznych:

- pozytywny wywiad i/lub badanie fizykalne;
- w badaniu nasienia liczba plemników poniżej 10 mln/ml;
- azoospermia (brak plemników w ejakulacie). Najczęstszą wadą genetyczną stwierdzaną u mężczyzny z niepłodnością jest zespół Klinefeltera (47, XXY). W badaniach hormonalnych zwykle stwierdza się hipogonadyzm hipergonadotropowy: stężenie testosteronu jest niskie, stężenie hormonu folikulotropowego (FSH, *follicle-stimulating hormone*) i hormonu luteinizującego (LH, *luteinizing hormone*) jest podwyższone. Jednak u wielu pacjentów z zespołem Klinefeltera stężenie testosteronu może znajdować się na dolnej granicy normy lub nawet w środku normy.

Nie zawsze diagnoza zespołu Klinefeltera jest prosta. Stężenia FSH mogą nie być podwyższone u pacjentów z polimorfizmem genu *FSH*, dlatego też w niektórych przypadkach jako zalecenie włączono analizę polimorfizmu genu *FSH*. Wykazano bowiem, że niektóre polimorfizmy genów receptora FSH wiążą się

z niekorzystnym rokowaniem co do uzyskania plemników podczas biopsji jąder. Badanie to pozwala więc uniknąć niepotrzebnej procedury biopsyjnej.

Ponadto okazało się, że u niektórych pacjentów z azoospermią, których przygotowano do procedur rozrodu wspomaganego (ART, *artificial reproductive technology*), analiza kariotypu z komórek uzyskanych podczas biopsji jąder wskazywała na zespół Klinefeltera, podczas gdy analiza kariotypu leukocytów krwi obwodowej była prawidłowa (tzw. mozaika).

U wszystkich pacjentów z zespołem Klinefeltera zaleca się długoterminową obserwację endokrynologiczną i zastępczą terapię androgenową.

Wskazania do określenia mutacji genu CFTR

Wskazania do określenia mutacji genu *CFTR* obejmują:

- azoospermię;
- nieprawidłowości strukturalne nasieniowodu (jednostronny lub obustronny brak nasieniowodu);
- obecność mutacji genu *CFTR* u partnerki.

W przypadku wykrycia mutacji genu *CFTR* u pacjenta należy wykluczyć obecność mutacji w tym genie u partnerki.

Mikrodelecje AZF

Badanie mikrodelecji AZF należy przeprowadzić u każdego pacjenta z azoospermią, przy czym azoospermia powinna być stwierdzona w dwóch badaniach nasienia wykonanych w odstępie 1–3 miesięcy.

Istotne jest, aby odróżnić azoospermię obturacyjną od nieobturacyjnej, ponieważ stwierdzenie niedrożności przewodów wyprowadzających nasienie wyklucza konieczność określenia mikrodelecji AZF, jeśli planuje się docytoplazmatyczne wstrzyknięcie plemnika (ICSI, *intracytoplasmic sperm injection*).

U mężczyzn z azoospermią obturacyjną (tj. spowodowaną niedrożnością dróg wyprowadzających nasienie) nie ma potrzeby badania w kierunku mikrodelecji AZF, ponieważ spermatogeneza u tych pacjentów powinna być prawidłowa.

Obturacyjna azoospermia (OA, *obstructive azoospermia*) występuje u około 15–20% mężczyzn z azoospermią. Azoospermia obturacyjna charakteryzuje się:

- brakiem plemników i komórek plemnikotwórczych w nasieniu i moczu po wytrysku;
- małą objętością nasienia (< 1,5 ml);
- prawidłowym (niepodwyższonym) stężeniem FSH;
- prawidłową objętością jąder w USG (> 15 ml);
- powiększeniem najądrza;
- niekiedy wrodzonym obustronnym brakiem nasieniowodu (CBAVD, *bilateral absence of the vas deferens*), w którym niedrożność najądrzy jest częstsza.

Dominującą przyczyną OA jest niedrożność najądrzy, która dotyka 30–67% mężczyzn z azoospermią. Może ob-

jawiać się jako CBAVD, gdy przewody wyprowadzające plemniki z jąder i w kierunku prącia nie rozwijają się, co wiąże się z 82% mutacji genu *CFTR*. Czasami może to wynikać z zespołu Younga, obejmującego wrodzoną niedrożność najądrzy oraz przewlekłe infekcje zatok i dróg oddechowych. Może również występować niedrożność nabyta, która jest zwykle wtórna do ostrej infekcji (gonokoki) lub infekcji subklinicznej (chlamydia); rzadziej występują urazy czy okluzja poopercyjna.

Jedyną opcją terapeutyczną dla pacjentów z nieobturacyjną azoospermią (NOA, *non-obstructive azoospermia*), u których obecne są plemniki w biopsji jądra, jest procedura ICSI przy użyciu świeżych lub kriokonserwowanych plemników. Plemniki pobiera się za pomocą ekstrakcji plemników jądra (TESE, *testicular sperm extraction*). W ten sposób udaje się je pozyskać u około 50% pacjentów z NOA.

Prawdopodobieństwo znalezienia plemników u pacjentów z kompletnymi mikrodelecjami AZFa i AZFb jest praktycznie zerowe, dlatego zabiegi TESE są w tym przypadku niecelowe.

Mężczyźni z mikrodelecjami Yq (i ich partnerki), którzy planują ICSI, powinni być poinformowani, że mikrodelecje (głównie AZFc) mogą być przenoszone na ich synów, ale nie na potomstwo poci żeńskiej.

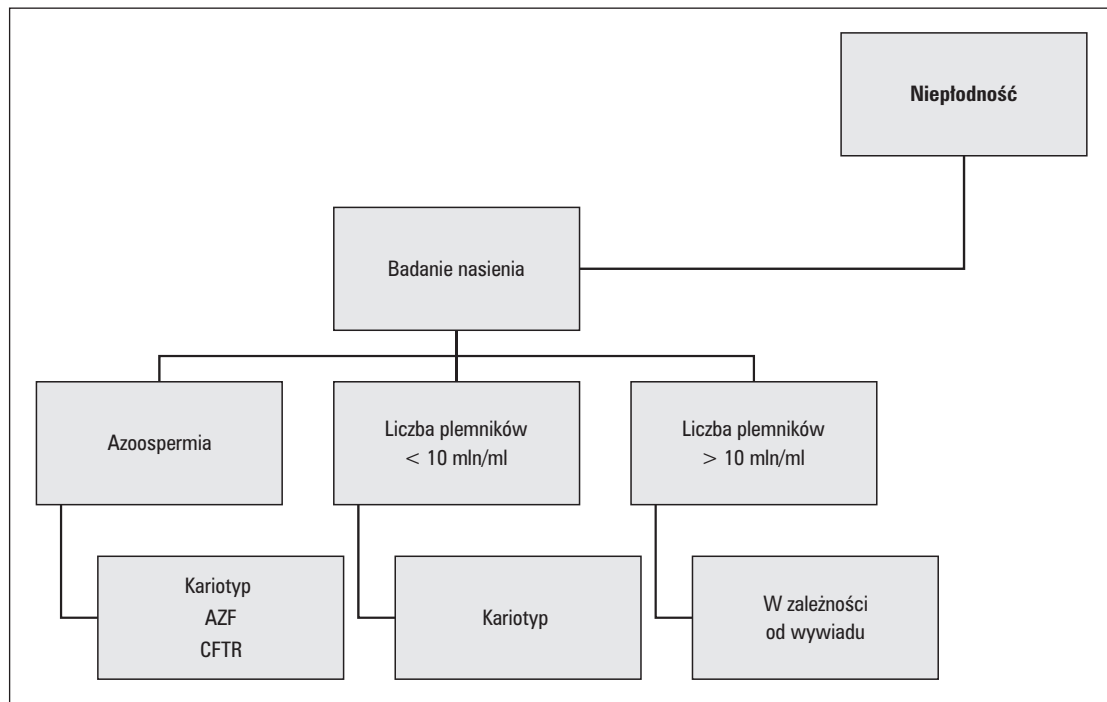
Analiza WES, WGS

Liczne doniesienia dostarczają dowodów przydatności sekwencjonowania całego eksomu/genomu w diagnozowaniu niepłodności męskiej. Techniki te doprowadziły do zidentyfikowania wielu patogennych lub potencjalnie patogennych mutacji w takich genach, jak m.in.: *ADGRG2*, *TEX11*, *MCM8*, *MEIOB*, *MEI1*, *DMC1*, *DNAH6*, *MAGEB4*, *NPAS2*, *PSMC3IP*, *SPINK2*, *STX2*, *SYCE1*, *TAF4B*, *TDRD7*, *TDRD9*, *TEX14*, *TEX15*, *XRCC2*, *ZMYND15* i innych związanych z niepłodnością męską [12–14]. Ostatnio Lu i wsp. przez badanie całoeksomowe (WES, *whole exome sequencing*) chromosomu X wykazali rolę mutacji w genie *BCORL1* w spermatogenezie [15].

Na rycinie 1 przedstawiono algorytm diagnostyki genetycznej.

Poradnictwo genetyczne dla pacjentów starających się o dziecko — zalecenia zdrowotne dla mężczyzn

Pary starające się o potomstwo mają coraz większą wiedzę na temat czynników wpływających na zdrowie dziecka. O narodzinach zdrowego dziecka decyduje także stan zdrowia jego ojca. Z tego powodu mężczyźni powinni być świadomi ryzyka uszkodzenia DNA plemników i unikać czynników, które mogą się do tego przyczynić [16]. Zalecenia zdrowotne dla mężczyzn starających się o dziecko obejmują:



Rycina 1. Algorytm diagnostyki genetycznej u mężczyzny z niepłodnością

1. Prowadzenie zdrowego stylu życia:

- niepalenie tytoniu — wykazano, że palenie papierosów nie tylko ma negatywny wpływ na morfologię plemników, ale także prowadzi do uszkodzeń DNA plemników. U dzieci ojców palących papierosy odsetek wad wrodzonych jest większy;
- ograniczenie spożycia kofeiny — wykazano, że duże dzienne spożycie kawy (powyżej 450 mg/d.) powoduje zwiększoną częstotliwość aneuploidii plemników;
- zmniejszenie spożycia alkoholu — spożycie w ilości mniejszej niż 8 jednostek tygodniowo nie ma wpływu na płodność mężczyzn, ale w ilości przekraczającej 20 jednostek niekorzystnie wpływa na jakość nasienia;
- powstrzymanie się od przyjmowania leków mogących niekorzystnie wpływać na spermatogenezę i powodować uszkodzenia DNA plemników;
- zalecenie krioprezewacji nasienia u mężczyzn zakwalifikowanych do leczenia chemioterapeutycznego lub radioterapeutycznego;
- utrzymanie prawidłowej masy ciała [prawidłowy wskaźnik masy ciała (BMI, *body mass index*) wynosi 20–25 kg/m²] [16]. Wykazano, że u otyłych mężczyzn z obwodem talii większym niż 94 cm liczba plemników jest zmniejszona o ponad 50% i częściej występuje aneuploidia plemników. Jednak Bandel i wsp. nie potwierdzili związku między BMI a integralnością DNA plemników [17]. Za oddzielny czynnik ryzyka uszkodzenia plemników uznano również smażenie na głębokim tłuszczu;

- unikanie przegrzania jąder;
 - unikanie ekspozycji na ftalany i inne chemikalia w tworzywach sztucznych (kosmetyki);
 - telefony komórkowe — istnieje wiele badań dotyczących wpływu używania telefonu komórkowego na płodność mężczyzn, jednak trudno jest udokumentować bezpośredni wpływ na uszkodzenie DNA plemników. Oficjalne wytyczne wskazują, że wpływ na plemniki nie jest potwierdzony;
 - zapobieganie i leczenie infekcji układu moczowo-płciowego, które są dość częstą przyczyną niepłodności i poronień u partnerki. Często infekcje te u mężczyzn są bezobjawowe, a jedynym symptomem jest nieprawidłowy wynik badania nasienia. Do wykrycia infekcji wykonuje się posiew nasienia. Za powszechne patogeny powodujące niepłodność uznaje się: *Ureaplasma urealyticum*, *Mycoplasma hominis*, *Chlamydia trachomatis* i *Neisseria gonorrhoeae*;
 - przyjmowanie witamin i suplementów — wykazano, że witaminy C i E są najskuteczniejszymi przeciwutleniaczami i przyczyniają się do zmniejszenia fragmentacji DNA. Ostatnie wyniki badań nie potwierdzają stosowania suplementacji kwasu foliowego i cynku przez partnerów płci męskiej do leczenia niepłodności [18–20].
2. Planowanie ojcostwa — im bardziej zaawansowany wiek ojca, tym większe ryzyko, że potomstwo będzie miało określone zaburzenia (np. autyzm i schizofrenię).

3. Konsultację genetyczną na etapie planowania ojcostwa w przypadku jakichkolwiek odchyleń stwierdzonych podczas diagnostyki andrologicznej.

Podsumowanie

Istnieje coraz więcej badań dotyczących wpływu zdrowia mężczyzny jako ojca na zdrowie jego dziecka. Aby zarodek (dziecko) był zdrowy, należy najpierw sprawdzić stan zdrowia przyszłego ojca. Wykazano wyraźny związek między wysokim odsetkiem uszkodzonych plemników we wskaźniku fragmentacji DNA (DFI, *DNA fragmentation index*) a większą częstością poronień i większym odsetkiem wad wrodzonych u dzieci. Znalezienie przyczyny tych uszkodzeń i ich usunięcie zwiększa prawdopodobieństwo urodzenia zdrowego dziecka przez partnerkę. Dotyczy to również metod wspomaganego rozrodu (ART).

Kluczowe znaczenie w poradnictwie genetycznym ma szerzenie wiedzy wśród lekarzy i zwiększanie świadomości pacjentów na temat czynników środowiskowych, które mają szkodliwy wpływ na płodność.

Odpowiednia diagnostyka i poradnictwo genetyczne mogą przyczynić się do poprawy stanu zdrowia dzieci w społeczeństwie.

Konflikt interesów

Autorzy oświadczają, że nie mają konfliktu interesów.

Finansowanie

Brak finansowania.

Zatwierdzenie etyczne

Niniejszy artykuł nie zawiera żadnych badań z udziałem ludzi lub zwierząt przeprowadzonych przez któregokolwiek z autorów.