

ГЕНЕТИЧЕСКИЕ ПРИЧИНЫ МУЖСКОГО БЕСПЛОДИЯ

В.П. Стусь, Н.Ю. Полион, Н.Ю. Семенюк

ГУ «Днепропетровская медицинская академия МЗ Украины»

Выявление генетических нарушений у пациентов с расстройствами репродуктивной функции позволяют улучшить лечебно-диагностическую и консультативно-диагностическую помощь супружеским парам с бесплодием, а также совершенствовать мероприятия, направленные на профилактику бесплодия [2]. Так, причинами бесплодия могут быть хромосомные аномалии, микроструктурные перестройки и генные мутации, которые могут приводить к нарушению детерминации пола, дифференцировки и/или развития органов половой системы, ее гормональной дисрегуляции, нарушению сперматогенеза и/или функции сперматозоидов [5].

Возможности исследования причин бесплодия у мужчин в последнее десятилетие значительно расширились благодаря расшифровке генома человека, секвенированию Y-хромосомы и внедрению современных молекулярных технологий в медицинскую практику, что позволило установить одну из причин нарушения репродуктивной функции у мужчин – микроделецию Y-хромосомы. Для систематизации и понимания генетических аномалий Y-хромосомы, их роли в развитии мужского бесплодия необходимо рассмотреть строение Y-хромосомы (Рис.).

Y-хромосома составляет менее 1% генома и является единственной хромосомой, которая всегда находится в гаплоидном состоянии. Имеет короткое плечо (p-плечо) и длинное плечо (q-плечо). Выделяют следующие районы Y-хромосомы:

- псевдоаутосомные области в теломерных районах p- и q- плеча Y-хромосомы;
- эухроматиновую область короткого плеча – Yp11;
- эухроматиновую область проксимальной части длинного плеча – Yq11;
- гетерохроматиновую область дистальной части длинного плеча – Yq12;

- область перичентромерного гетерохроматина.

Роль делеций длинного плеча Y-хромосомы в этиологии нарушения сперматогенеза и бесплодия у мужчин была описана в 1976 году. Выдвинуто предположение о наличии участка в локусе Yq11, необходимого для сперматогенеза, который был назван фактором азооспермии (azoospermia factor) [13].

В проксимальной части эухроматиновой области длинного плеча (Yq11) картированы гены, которые входят в состав локуса AZF. Локус AZF разделяется на три региона – AZFa, AZFb, AZFc, каждый из которых содержит гены-кандидаты, мутации в которых приводят к различной степени нарушений сперматогенеза.

Субрегион AZFa содержит три гена: USP9Y, DBY, UTY. Отсутствие USP9Y или DBY приводит к нарушению процесса сперматогенеза [4].

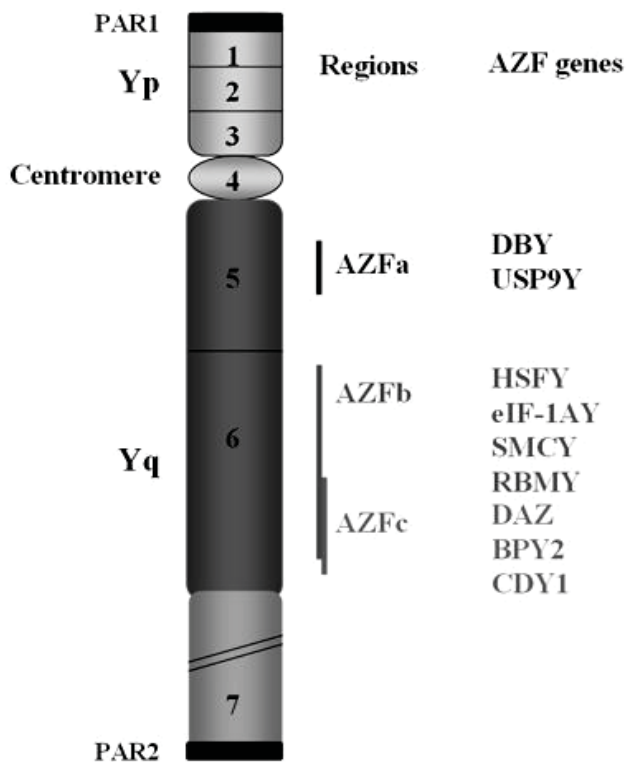
Субрегион AZFb содержит два гена: E1F1AY и RBMY. Делеция копии или копий гена RBMY может быть связана с азооспермией или олигозооспермией [1].

Субрегион AZFc содержит 8 генов: DAZ, BPY2, CDY1, CSPG4LYP2, GOLGA2LY, TTY3 и TTY4.

Делеции в локусе AZF могут быть полными (целиком удаляющими один AZF регион и более) и частичными (делеции не полностью захватывают один из трех регионов).

Микроделеции, охватывающие весь регион AZF или субрегионы AZFa, AZFb, AZFc, приводят к полному отсутствию здоровых сперматозоидов. У 50% пациентов с делецией, целиком захватывающий AZFc-регион, удается получить сперматозоиды, пригодные для искусственного оплодотворения. Малое количество сперматозоидов и ограниченная их подвижность, не дают возможности физиологического оплодотворения. Поэтому оплодотворение проводят

in vitro методом введения сперматозоида в цитоплазму ооцита (ICSI), а получение сперматозоидов для ICSI требует хирургического вмешательства. Во всех случаях у пациентов с симптомами необструктивной азооспермии и олигозооспермии тяжелой степени рекомендовано проводить предварительный анализ микроделеций AZF-региона для дифференциального диагноза и определения возможности проведения ICSI. [6]. Учитывая прогрессирование нарушения сперматогенеза от олигозооспермии до азооспермии у пациентов с AZF-микроделециями, необходимо таким пациентам рекомендовать криоконсервацию полученных сперматозоидов [10].



Схематическое изображение Y-хромосомы, показывающее 7 интервалов делеции. 3 AZF региона и гены-кандидаты AZF указаны. Псевдоаутосомальные области 1 и 2 (PAR1, PAR2); Yp: короткое плечо хромосомы Y; Yq: длинное плечо Y-хромосомы

Согласно рекомендациям Европейской ассоциации репродуктологов и эмбриологов (ESHRE) при проведении диагностики микроделеций Y-хромосомы кандидатами для анализа являются мужчины, концентрация сперматозоидов в эякуляте которых составляет $< 5 \cdot 10^6$ /мл [3].

Делеции AZFa- и AZFb- субрегионов ассоциированы с невозможностью получения зрелых половых клеток, в отличие от делеций AZFc субрегиона, когда имеется высокая вероятность получения зрелых сперматозоидов. Однако, даже при использовании репродуктивных технологий имеется высокий риск рождения мальчиков с Y-микроделециями.

В своей работе мы поставили цель установить частоту делеции в локусе AZF у больных с идиопатическим бесплодием.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

Под нашим наблюдением находилось 80 мужчин с идиопатическим бесплодием в возрасте 19-40 лет. Всем пациентам проводилось общеклиническое и урологическое исследование: общий анализ крови, общий анализ мочи, реакция Вассермана, сахар крови, биохимическое обследование крови, гормональное обследование (тестостерон, ЛГ, ФСГ, пролактин), карiotипирование, ультразвуковое исследование органов мошонки и предстательной железы, микроскопическое и бактериологическое исследования эякулята, исследование на инфекции, передающиеся половым путем.

18 пациентам с концентрацией сперматозоидов в эякуляте $< 5 \cdot 10^6$ /мл проводилось генетическое исследование крови на наличие делеций в AZF локусе Y-хромосомы. Выделение и очистка ДНК из цельной венозной крови проходила с помощью стандартного метода осаждения нуклеиновых кислот. Для анализа вариаций делеции регионов гена AZF проводилась специфическая амплификация ДНК in vitro [7, 8, 11, 12, 14].

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

При исследовании гормонального фона у пациентов не было выявлено гормональных нарушений, а уровень тестостерона составил $13,45 \pm 6,35$ нмоль/л, уровень ЛГ $17,25 \pm 6,25$ МЕ/л, уровень ФСГ $9,0 \pm 8,2$ МЕ/л, уровень пролактина 710 ± 640 мМЕ/л. Концентрация сперматозоидов в эякуляте в среднем составляла $14,9 \cdot 10^6 \pm 14,9 \cdot 10^6$ /мл.

В исследуемой группе из 18 больных идиопатическим бесплодием с концентрацией сперматозоидов в эякуляте $< 5 \cdot 10^6$ /мл, после прове-

денного обстеження, виявлені делеції в локусі AZF у 2 пацієнтів (11,11%)

Результати численних досліджень, в тому числі і нашого, вказують на важливу роль делецій в локусі AZF Y-хромосоми в контролі сперматогенезу у людини.

Фактор азооспермії є однією з найчастіших причин безпліддя у чоловіків, що обумовлює широке поширення дослідження цього фактора в останні роки. Виходячи з даних світової літератури і власних

наблюдень, очевидна необхідність дослідження фактора азооспермії у всіх чоловіків з азооспермією/олігозооспермією тяжкої ступені.

ЗАКЛЮЧЕННЯ

Визначення частоти делецій в локусі AZF є важливим методом дослідження причин азооспермії/олігозооспермії тяжкої ступені у чоловіків з безпліддям.

Список літератури

1. Денисенко С.В., Дарій А.С., Кононенко М.І., Зерова-Любимова Т.Є. Генетика репродукції. – К.: Ферзь-ТА, 2008. – С. 128 – 139.
2. Оцінка якісних показників еякуляту у пацієнтів з безпліддям / І.І. Горпинченко, О.Д. Нукитин, С.В. Базалицька і др. // Здоров'я чоловіка. – 2012. – № 3 (42). – С. 112 – 115.
3. A simple, low cost and non-invasive method for screening Y-chromosome microdeletions in infertile men / Aknin-Siefer I.E., Touraine R.L., Lejeune H. et al. // Hum. Reprod. – 2003. – N18. – P. 257 – 261.
4. Divergent outcomes of intrachromosomal recombination of the human Y chromosome: male infertility and recurrent polymorphism / Blanco P., Shlumkova M., Sargent C.A. et al. // J. Med. Genet. – 2000. – P.752 – 758.
5. Foresta C. Y chromosome and male infertility: Update, 2006. Csilla Krausz and Selene Degl'Innocenti // Frontiers in Bioscience. – 2006. – N11. – P.3049 – 3061.
6. Foresta C., Ferlin A., Gianaroli L., Dallapiccola B. Guidelines for the appropriate use of genetic tests in infertile couples // Eur.J.Hum.Genet. – 2002. – N10. – P.303 – 312.
7. Taq Start Antibody: "Hot start" PCR facilitated by a neutralizing monoclonal antibody directed against Taq DNA polymerase / Kellogg D.E., Rybalkin I., Chen S. et al. // Biotechniques. – 1994. – N16. – P. 1134 – 1137.
8. Kostiner D.R., Turek P.J., Reijo R.A. Male infertility analysis of the markers and genes on the Y chromosome // Hum Reprod. – 1998. – N13. – P. 3032 – 3038.
9. A high frequency of Y chromosome deletions in males with nonidiopathic infertility / Krausz C., Quintana-Murci L. Barboux S. et al. // J. Clin. Endocrinol. Metab. – 1999. – P.3606 – 3612.
10. Krausz C., McElreavey K. Y chromosome and male infertility // Front.Biosci. – 1999. – N4. – P.1 – 8.
11. Amplification of cDNA ends based on template – switching effect and stepout PCR/ Matz M., Shagin D., Bogdanova E. et al. // Nucleic Acids Res. – 1999. – N27. – P.1558 – 1560.
12. Laboratory guidelines for molecular diagnosis of Y-chromosomal microdeletion/ Simoni M. et al. // Intern J Andrology. – 1999. – N22. – P.292 – 299.
13. Tiepolo L., Zuffardi O. Localisation of factors controlling spermatogenesis in nonfluorescent portion of the human chromosome Y long arm // Hum Genet. – 1976. – N34. – P.119 – 124.
14. Human Y chromosome azoospermia factors (AZF) mapped to different subregions in Yq11 / Vogt P.H., Edelmann A., Kirsh S. et al. // Hum Mol Genet. – 1996. – N5. – P.933 – 943.

Реферат

ГЕНЕТИЧНІ ПРИЧИНИ ЧОЛОВІЧОГО БЕЗПЛІДДЯ

В.П. Стусь, М.Ю. Поліон, М.Ю. Семенюк

Можливості дослідження причин безпліддя у чоловіків значно розширилися завдяки роз-

Summary

GENETIC CAUSES OF MALE INFERTILITY

V.P. Stus, M.Y. Polion, M.Y. Semenyuk

The possibility of investigating the causes of infertility in men increased significantly thanks to

шифровці генома людини, секвенуванню Y-хромосоми і впровадженню сучасних молекулярних технологій у медичну практику. Нами обстежено 80 чоловіків з ідіопатичним безпліддям, яке включало в загальноклінічне та урологічне дослідження: загальний аналіз крові, загальний аналіз сечі, реакція Вассермана, цукор крові, біохімічні обстеження крові, гормональне обстеження (тестостерон, ЛГ, ФСГ, пролактин), каріотипування, ультразвукове дослідження органів калитки і передміхурової залози, мікроскопічне і бактеріологічне дослідження еякуляту, дослідження на інфекції, які передаються статевим шляхом.

18 пацієнтам з концентрацією сперматозоїдів в еякуляті $< 5 \cdot 10^6$ /мл проводилося генетичне дослідження крові на наявність делецій в AZF локусі Y-хромосоми. Виділення та очистка ДНК із цільної венозної крові проходила за допомогою стандартного методу осадження нуклеїнових кислот. Для аналізу варіацій делеції регіонів гена AZF проводилася специфічна ампліфікація ДНК *in vitro*. У досліджуваній групі (18 хворих) делеції в локусі AZF були виявлені у 2 пацієнтів (11,11%).

Згідно з даними світової літератури та за результатами власних спостережень очевидно є необхідність дослідження фактора азооспермії всім чоловікам з азооспермією/олігозооспермією важкого ступеня.

Ключові слова: чоловіче безпліддя, Y-хромосома, AZF делеції

the human genome, the sequencing of the Y-chromosome, and the introduction of modern molecular techniques in medical practice. We conducted a survey of 80 men with idiopathic infertility, which included clinical and urological examination: complete blood count, urinalysis, Wassermann, blood sugar, blood biochemical examination, hormonal examination (testosterone, LH, FSH, prolactin), karyotyping, ultrasound examination of the scrotum and prostate, microscopic and bacteriological examination of ejaculate, a study on sexually transmitted infections.

18 patients with the concentration of sperm in the ejaculate $< 5 \cdot 10^6$ /ml conducted a genetic blood test for the presence of deletions in the AZF locus Y-chromosome. Isolation and purification of DNA from whole venous blood passes through a standard method of precipitation of nucleic acids. For the analysis of the variations of the gene regions of AZF deletions specific DNA amplification was carried out *in vitro*. In the study group (18 patients) in the locus AZF deletions were detected in 2 patients (11.11%).

According to the world of literature and the results of his observations is obvious need for research azoospermia factor for all men with azoospermia/oligozoospermia severe.

Key words: male infertility, Y-chromosome, AZF deletions