

Аномалии половых хромосом при мужской инфертильности

О.Д. Никитин¹, С.В.Базалицкая²

¹Национальный медицинский университет им. А.А. Богомольца, г. Киев

²ГУ «Институт урологии НАМН Украины», г. Киев

Проанализированы результаты обследования 456 пациентов, которым проводили кариотипирование. Нарушение сперматогенеза выявлено у 147 пациентов, что составляет 32,2%. В соответствии с цитогенетическим анализом аномалии кариотипа составили 14,9% случаев от общего количества обследуемых пациентов, то есть – у 68 мужчин были определены приведенные выше изменения структуры хромосом.

В результате исследования делеции локуса AZF были обнаружены в 3,6% случаев, а именно: у двух пациентов с азооспермией (4,8% случаев для данной группы).

Инфертильным пациентам, которым назначено лечение с помощью ИКСИ, следует проводить генетические консультации и наряду с кариотипированием выполнять анализ AZF-участка Y-хромосомы. Дальнейшие исследования позволяют выяснить патогенетическую значимость различных типов микроструктурных перестроек Y-хромосомы, а также установить факторы, влияющие на их экспрессивность.

Ключевые слова: нарушение репродуктивной функции, хромосомные аномалии, сперматогенез.

Хромосомные aberrации – это изменения числа и структуры хромосом. Хромосомные аномалии у мужчин, приводящие к нарушениям репродукции, могут затрагивать как половые хромосомы, так и аутосомы: эти нарушения могут быть регулярными (выявляться во всех клетках тела) или мозаичными (характеризовать определенный клон клеток). Хромосомные aberrации, выявляемые только в сперматозоидах, являются частой находкой. У здоровых мужчин от 1 до 15% сперматозоидов могут иметь хромосомные аномалии, большая часть которых представляют собой структурные перестройки.

В обзоре исследований, включивших 9766 бесплодных мужчин, частота хромосомных аномалий составила 5,8% [9]. Изменения в Y-хромосоме наблюдались у 4,2%, а отклонения в аутосомных хромосомах у 1,5% бесплодных мужчин. Для сравнения: уровень отклонений, по данным 3 крупных исследований, среди 94 465 новорожденных младенцев мужского пола составил 0,38%, из которых у 131 (0,14%) были изменения в половых хромосомах и у 232 – aberrации в аутосомных хромосомах (0,25%) [12].

Чем тяжелее тестикулярная недостаточность, тем выше встречаемость хромосомных aberrаций. У пациентов с концентрацией сперматозоидов менее 10×10^6 /мл в 10 раз чаще (4%) по сравнению с общей популяцией встречаются нарушения аутосомных хромосом преимущественно структурного характера [14]. Наибольший риск выявления хромосомных aberrаций отмечается у мужчин с азооспермией. На основании частоты встречаемости хромосомных aberrаций у пациентов с различной концентрацией сперматозоидов кариотипирование рекомендуется проводить мужчинам с азооспермией и с олигозооспермией при концентрации сперматозоидов менее 10×10^6 /мл [12]. При наличии семейного анамнеза рецидивирующих аборт, задержки умственного развития рекомендовано проведение анализа кариотипа независимо от концентрации сперматозоидов.

В парах с привычным невынашиванием беременности частота хромосомных аномалий у мужчин составляет около 5%. В случае спонтанных абортов частота хромосомных аномалий у мужчин составляет 1,5–2%; если спонтанные аборты сочетаются с мертворождениями или врожденными пороками развития, частота аномалий кариотипа у мужчин составляет 4–4,5%.

Генетические факторы являются одной из частых причин аномалий развития и нарушения функции органов репродуктивной системы [1]. Частота их встречаемости коррелирует с тяжестью репродуктивной патологии. Так, по крайней мере 1/3 случаев тяжелых форм бесплодия у мужчин обусловлена генетическими факторами [2]. Причинами бесплодия у мужчин могут быть хромосомные аномалии, микроструктурные перестройки и генные мутации, приводящие к нарушению детерминации пола, дифференцировки или развития органов половой системы, ее гормональной дисрегуляции, нарушению сперматогенеза и функции сперматозоидов [3].

Помимо хромосомных аномалий, чаще всего представляющих синдромом Кляйнфельтера или его вариантами, одной из наиболее распространенных генетических причин необструктивной азооспермии или олигозооспермии являются микроделеции Y-хромосомы. Установлена связь между мужским бесплодием и делециями, возникающими в Y-хромосоме, что свидетельствует о присутствии генов, необходимых для развития мужских зародышевых клеток [4].

Сперматогенез – сложный биологический процесс, который зависит от точно контролируемого каскада включения и выключения определенных генов, которые запускают процесс пролиферации сперматогоний, инициации и завершения мейоза и морфологическую дифференцировку сперматид в зрелые сперматозоиды. Мутации в любом из этих генов могут оказывать большое влияние на сперматогенез в целом. Y-хромосома составляет 2–3% гаплоидного генома человека. Это акроцентрическая хромосома, которая содержит короткое (Yp) и длинное (Yq) плечи, разделенные центромерным участком, необходимым для хромосомной сегрегации, и которые в совокупности занимают 60 млн пар нуклеотидов. Число генов является наименьшим по сравнению с любой другой хромосомой: из 27 генов Y-хромосомы, – 9 находятся на Yp, 18 – на Yq.

Роль делеций длинного плеча Y-хромосомы в этиологии нарушения сперматогенеза и бесплодия у мужчин была впервые наглядно показана в исследовании Tiepolo и Zuffardi [13]. Авторы предположили наличие в локусе Yq11 участка, отвечающего за сперматогенез, названного фактором азооспермии (Azoospermia Factor, AZF). В дальнейшем с появлением методов молекулярного анализа было подтверждено присутствие на длинном плече Y-хромосомы генов, контролирующей дифференцировку мужских половых клеток, создана карта делеционных интервалов Y-хромосомы. Согласно размерам и локализации делеций длинного плеча Y-хромосомы, выделены три региона: AZFa, AZFb и AZFc [6].

Результаты исследований Y-хромосомы человека свидетельствуют о том, что ее палиндромная область, располагающаяся в локусе AZF, является наиболее сложно устроенным в отношении протяженных блоков участком во всем геноме человека, значительно варьирует по составу и композиции повторов и имеет одну из самых высоких частот мутаций [7]. Установлено, что наличие частичной делеции региона AZFc может predisполагать к возникновению полной делеции данного региона [8]. Важно отметить, что исследование только STS-маркеров данного региона не всегда позволяет точно определить тип перестройки Y-хромосомы. Вследствие многократности оценка числа генов данного региона возможна с помощью анализа однонуклеотидных полиморфизмов для количественного определения генов (DAZ, CDY и др.) данного региона [9]. Проведение описанного выше исследования позволяет точнее определить тип микроструктурной перестройки Y-хромосомы.

В некоторых исследованиях выявлено, что частота оплодотворения при использовании сперматозоидов, полученных от пациентов с Y-микроделециями, и развитие эмбрионов были сравнимы с соответствующими показателями при использовании сперматозоидов без делеций [10, 11]. Так, частота оплодотворения, дробления и наступления беременности после проведения ИКСИ у больных, страдающих азооспермией и имеющих Y-делеции, составила соответственно 47, 58 и 29%, а у пациентов с таким же диагнозом, но интактной Y-хромосомой – соответственно 42, 62 и 29%. При олигозооспермии эти показатели составили 64, 56 и 46% при интактной Y-хромосоме и 68, 65 и 50% при наличии Y-микроделеций.

Оценка состояния сперматогенеза имеет важное диагностическое значение при различных формах нарушения репродуктивной функции. С этой целью разработан ряд методов, основанных на исследовании морфологии и состава по стадиям развития половых клеток. Традиционный спермиологический анализ является начальным звеном в цепи лабораторных исследований и позволяет судить о количестве сперматозоидов, их подвижности, жизнеспособности и морфологии, наличии незрелых половых клеток. Однако данный метод не дает полной картины состояния каждой из стадий гаметогенеза.

Анализ гистопрепаратов биоптата яичка позволяет более глубоко и полно оценить состояние сперматогенеза. Наряду с преимуществами метод не лишен недостатков, так как процедура биопсии может сопровождаться различными осложнениями (например, развитием аутоиммунных процессов), поэтому показания к биопсии весьма ограничены. Среди недостатков метода следует отметить возможность анализа только фрагмента одного яичка. Как известно, нарушение функции системы репродукции может быть генетически обусловлено. За последние несколько лет были картированы гены, продукты которых регулируют развитие и функцию гонад. Описаны мутации в генах, приводящие к нарушению процесса гаметогенеза. Известно, что хромосомные аномалии (ХА) также приводят к нарушению репродуктивной функции. Среди хромосомопатий специалисты различают структурные и числовые ХА. В общей популяции уровень ХА невелик и составляет 0,5–3,0%, в то время как среди пациентов с нарушением фертильности доля лиц с ХА возрастает до 7–10%, а, например, среди мужчин с азооспермией достигает 20%. Эти данные свидетельствуют о необходимости цитогенетического исследования у пациентов с нарушением репродуктивной функции. Также необходимо исследовать хромосомный набор половых клеток (ПК) для исключения

гонадного мозаицизма. В случае выявления последнего следует провести расчет риска рождения ребенка с наследственной патологией [4].

Цитогенетическое исследование незрелых гамет на разных стадиях их развития у мужчин проблематично вследствие относительной трудности получения материала. При биопсии яичка возможен анализ хромосом ПК, находящихся на определенных стадиях своего развития (сперматоциты на стадии пахитены, диакинеза-метафазы I, метафазы II), но биопсия яичка показана лишь узкой группе пациентов с а- и олигозооспермией III степени. В 90-х годах XX века был разработан метод флуоресцентной гибридизации *in situ* (FISH), при котором возможно анализировать ХА в ядрах не только клеток, находящихся на стадии метафазы, но и интерфазных соматических и ПК [6].

Флуоресцентная гибридизация *in situ* (FISH – fluorescence *in situ* hybridization) заключается в проведении процедуры молекулярной гибридизации ДНК зонда с ДНК фиксированного на стекле материала (интерфазных ядер или метафазных хромосом) с последующим использованием флуоресцентной микроскопии для детекции результатов гибридизации. Для идентификации индивидуальных хромосом при проведении диагностики наиболее эффективны так называемые хромосомоспецифичные ДНК-зонды, созданы на основе клонированных последовательностей сателлитной ДНК человека. Но хромосомы 4 и 9, 5 и 19, 13 и 21, 14 и 22 содержат практически идентичные и неотличимые при гибридизации *in situ* варианты альфоидной ДНК и следовательно надежно идентифицировать эти хромосомы с помощью FISH на основе альфоидных ДНК-зондов нельзя. Поэтому широкое применение находят также сайт-специфические (локус-специфические) ДНК-зонды, которые маркируют индивидуальные хромосомные участки или индивидуальные гены [1].

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Проанализированы результаты обследования 456 мужчин, которым проводили кариотипирование. Для данного анализа использовали стандартную методику культивирования лимфоцитов периферической крови и приготовление препаратов метафазных хромосом и интерфазных клеток. Кровь для цитогенетического анализа получали путем пункции локтевой вены, после чего цельную кровь добавляли к питательной среде. Культивирование проводили при температуре +37 °С в течение 72 ч. Для накопления лимфоцитов в стадии метафазы вводили колхицин. По окончании культивирования клетки с питательной средой центрифугировали и полученный осадок подвергали гипотонической обработке 0,075M раствором калия хлорида до 20 мин при температуре +37 °С. Затем клетки фиксировали в трех сменах охлажденной до +4 °С смеси этанол-уксусной кислоты в соотношении 3:1, приготовленной *ex tempore* (перед использованием). После окончательного центрифугирования и удаления супернатанта суспензию клеток раскапывали на охлажденные влажные стекла и высушивали на воздухе. Окрашивание препаратов проводили GTG-методом [2]. Для каждого пациента анализировали 15–30 метафазных пластинок с разрешением 550 сегментов на гаплоидный набор [5].

Пациентам с нарушением сперматогенеза проводили молекулярно-цитогенетическое исследование методом FISH на сперматозоидах с предварительной их декондесацией. С целью определения уровня анеуплоидий сперматозоидов использовали многоцветную пробу AneuVysion для хромосом X, Y, 18, 13, 21 (Abbott-Vysis, USA).

БЕСПЛОДИЕ И ПЛАНИРОВАНИЕ СЕМЬИ

Подготовку препаратов проводили непосредственно после сдачи пациентом эякулята. Необходимый объем спермы помещали в пробирку и трижды отмывали фосфатным буфером, после чего раскапывали на стекла и сушили 1 ч при температуре +50 °С. Затем стекла опускали в емкость с фиксатором и оставляли на 18 ч при температуре -20 °С. По прошествии указанного времени проводили деконденсацию путем инкубации в 0,1N растворе натрия гидроксида, после чего стекла споласкивали в фосфатном буфере и просушивали на воздухе. Далее проводили предгибризационную подготовку препарата и наносили пробы CEP 18/X/Y и LSI 13/21 на предварительно отмеченные зоны гибридизации. Стекло с нанесенными зондами помещали в гибридизатор с установленной программой денатурации и гибридизации при температуре +37 °С с длительностью от 4 до 12 ч. Затем для удаления негибридизовавшихся проб, а также с целью уменьшения кросс-гибридизации альфоидных последовательностей с центромерными участками других хромосом, стекла подвергают отмывке. Далее препараты окрашивают и проводят детекцию флуоресцентных сигналов согласно стандартному протоколу. Микроскопический анализ осуществляют с ис-

пользованием флуоресцентного микроскопа, оборудованного соответствующим набором фильтров и программой автоматической обработки изображения, в данном случае программа ISIS. Для исследования уровня анеуплоидий в сперматозоидах проводили анализ 1000 клеток [7, 8].

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Нарушение сперматогенеза выявлено у 147 пациентов, что составляет 32,2% от общего количества анализируемых случаев (табл. 1).

В свою очередь группа пациентов с нарушением сперматогенеза была представлена такими вариантами патоспермии, как азооспермия (129 пациентов), астенозооспермия (6 пациентов), олигоастенозооспермия (4 пациента), олигозооспермия, астенотератозооспермия, криптозооспермия, амиоастенотератозооспермия (по 2 пациента) (табл. 2).

В соответствии с цитогенетическим анализом аномалии кариотипа составили 14,9% случаев от общего количества обследуемых пациентов, то есть у 68 мужчин были определены описанные выше изменения структуры хромосом. В табл. 3

Таблица 1

Количество обследованных больных и удельный вес пациентов с патоспермией

Пациенты	2009 г.	2010 г.	2011 г.	Всего
Общее количество пациентов, которым проводили кариотипирование	146	195	115	456
Количество пациентов с нарушением сперматогенеза	36	58	53	147
%	24,7	29,7	46,0	32,2

Таблица 2

Характеристика пациентов с нарушениями сперматогенеза

Нарушения сперматогенеза	2009 г.	2010 г.	2011 г.	Всего
Азооспермия	33	52	44	129
Астенозооспермия	1	2	3	6
Олигоастенозооспермия	-	2	2	4
Олигозооспермия	-	1	2	3
Астенотератозооспермия	1	-	1	2
Криптозооспермия	1	-	1	2
Амиоастенотератозооспермия	-	1	-	1
Всего	147			

Таблица 3

Количественная характеристика аномалий кариотипа

Показатели	2009 г.	2010 г.	2011 г.	Всего
Общее количество пациентов, которым проводили кариотипирование	146	195	115	456
Количество пациентов с аномалиями кариотипа	20	29	19	68
%	13,7	14,9	16,5	14,9
Транслокации	3	3	2	8
Синдром Кляйнфельтера	1	3	1	5
Инверсии	4	6	3	13
Увеличение гетерохроматинового района аутосом	2	5	3	10
Увеличение гетерохроматинового района хромосомы Y	-	3	-	3
Уменьшение гетерохроматинового района хромосомы Y	5	6	4	15
Увеличение спутников и спутничных нитей акроцентрических хромосом	7	8	6	19

Таблица 4

Удельный вес аномалий кариотипа среди пациентов с нарушением сперматогенеза

Показатели	2009 г.	2010 г.	2011 г.	Всего
Количество пациентов с нарушением сперматогенеза	36	58	53	147
Количество пациентов с аномалиями кариотипа	5	12	9	26
%	13,9	20,7	17	17,7
Транслокации	2	-	1	3
Синдром Кляйнфельтера	1	3	1	5
Инверсии	-	3	1	4
Увеличение гетерохроматинового района аутосом	-	1	2	3
Увеличение гетерохроматинового района хромосомы Y	-	2	1	3
Уменьшение гетерохроматинового района хромосомы Y	2	2	1	5
Увеличение спутников и спутничных нитей акроцентрических хромосом	-	2	2	4

представлены общие количественные характеристики аномалий кариотипа.

При рассмотрении кариотипов группы пациентов с нарушением сперматогенеза оказалось, что процент аномалии структуры хромосом выше и составляет 17,7 %, что приведено в табл. 4.

По данным молекулярно-цитогенетического анализа методом FISH уровень анеуплоидий в сперматозоидах был в диапазоне от 2,5% до 15,4%, тогда как в норме процент нерасхождений хромосом не должен превышать 2,5% [7]. При анализе сперматозоидов встречались такие варианты анеуплоидий, как наличие двух половых хромосом (XX, YY, XY) или нулисомия по половым хромосомам, наличие нескольких половых хромосом и аутосом (XXY 1818, XX 1818, XY 1818, XYY 1818), нулисомия по аутосомным хромосомам (X₁, Y₁, 13₁, 21₁), присутствие нескольких аутосом (1313 21, 13 2121, 1313 2121).

Таким образом, было установлено, что нерасхождение по половым хромосомам составило от 1,2% до 2,5%, по хромосоме 18 вариabельность показателя была от 0,4% до 2,1%. Уровень анеуплоидий хромосомы 13 был установлен в диапазоне от 0,5% до 3,5%, а по хромосоме 21 показатель нерасхождения находился в пределах от 0 до 8,7% при том, что уровень анеуплоидии в норме по одной хромосоме не должен быть выше 0,5% [3, 7].

Для обнаружения делеций применяли мультиплексную амплификацию согласно руководству, предложенному Simoni и соавторами [10, 11]. Делеции детектировали в регионах AZF локуса Y-хромосомы с помощью следующих STS-маркеров:

sY746, sY84; sY85; sY86; USP9Y; RBMY1; sY117; sY124; sY127; sY134; sY141; sY153; sY240; sY146; sY254; sY255; sY158; sY160.

По литературным данным, частота делеций локуса AZF составляет 7,5% в различных популяциях [11].

В результате нашего исследования делеции локуса AZF в выборке больных (55 пациентов) были обнаружены в 3,6% случаев, а именно – у двух пациентов с азооспермией (4,8% случаев для данной группы) (табл. 5). Различия в полученных нами показателях и данных, отраженных в доступной литературе исследований, могут быть обусловлены немногочисленной группой обследованных.

Тот факт, что все микроделеции были выявлены в локусе AZFc хромосомы Y, указывает на то, что эти мутации занимают преобладающее место среди микроделеций AZF локу-

Встречаемость делеции Y-хромосомы среди обследуемых пациентов

Таблица 5

Патология	Количество обследованных пациентов	Количество выявленных делеций	%
Азооспермия	42	2	4,8
Олигозооспермия	8	-	-
Астенозооспермия	4	-	-
Аспермия	1	-	-
Всего	55	2	3,6

сов хромосомы Y, что также совпадает с мнением других авторов [11]. Учитывая высокий уровень сперматозоидов с хромосомными aberrациями у пациентов программы ИКСИ, мы рекомендуем исследовать их половые клетки на уровень анеуплоидии перед использованием вспомогательных репродуктивных технологий для установления потенциального риска появления в потомстве ребенка с генетической патологией. Использование в программе ИКСИ гамет с хромосомными изменениями может негативно влиять на эффективность программы и привести к рождению детей с хромосомными aberrациями. Таким образом, супружеским парам, у мужей которых в сперматозоидах имеется повышенная частота анеуплоидии, рекомендуется проведение преимплантационной или инвазивной пренатальной диагностики.

ВЫВОДЫ

Генетическое обследование пациентов с нарушением репродуктивной функции имеет важное значение ввиду выявления у них высокой частоты генетических мутаций.

Знания о частоте и характере генетических нарушений у пациентов с нарушением репродуктивной функции позволяют улучшить лечебно-диагностическую и консультативно-диагностическую помощь супружеским парам с бесплодием, а также совершенствовать мероприятия, направленные на профилактику бесплодия.

Результаты проведенного обследования свидетельствуют о необходимости разработки и широкого внедрения в медицинскую практику профилактических мероприятий, в частности преимплантационной генетической диагностики, ко-

торая проводится в рамках программы экстракорпорального оплодотворения и дает возможность генетической селекции эмбрионов у пациентов с генетическими нарушениями.

По рекомендации международных организаций, занимающихся проблемами бесплодия, инфертильным пациентам, которым назначено лечение с помощью ИКСИ, следует проводить генетические консультации и наряду с кариотипированием выполнять анализ AZF-участка Y-хромосомы. Дальнейшие исследования позволят выяснить патогенетическую значимость различных типов микроструктурных перестроек Y-хромосомы, а также установить факторы, влияющие на их экспрессивность.

Аномалії статевих хромосом у разі чоловічої інфертильності

О.Д. Нікітін, С.В. Базалицька

Проаналізовано результати обстеження 456 пацієнтів, яким проводилось кариотипування. Порушення сперматогенезу виявлено у 147 пацієнтів, що складає 32,2%. Відповідно до цитогенетичного аналізу аномалії кариотипу склали 14,9% випадків, тобто у 68 чоловіків були визначені наведені вище зміни структури хромосом.

Делеції локусу AZF були виявлені в 3,6% випадків, а саме – у двох пацієнтів з азооспермією (4,8% випадків для даної групи).

Інфертильним пацієнтам, яким призначено лікування за допомогою ІКСІ, слід проводити генетичні консультації і разом з кариотипуванням виконувати аналіз AZF-ділянки Y-хромосоми. Подальші дослідження дозволять з'ясувати патогенетичну значущість різних типів микроструктурних перебудов Y-хромосоми, а також встановити фактори, що впливають на їх експресивність.

Ключові слова: порушення репродуктивної функції, хромосомні аномалії, сперматогенез.

Anomalies of sex chromosomes in male infertility

O. Nikitin, S. V. Bazalitska

Analyzed the results of a survey 456 patients who underwent karyotyping. Disruption of spermatogenesis was detected in 147 patients, accounting for 32,2%. In accordance with the cytogenetic analysis of karyotype abnormalities were 14,9% of cases, the total number of patients under investigation 68 men have been identified above changes in the structure of chromosomes.

The study of locus deletions AZF were detected in 3,6% of cases, namely – in two patients with azoospermia (4,8% of cases for this group).

Infertile patients, who received treatment with ICSI, should be carried out genetic counseling and, in addition to karyotyping, review AZF-site Y-chromosome. Further studies will clarify the pathogenetic significance of different types of microstructure of Y-chromosome rearrangements, as well as to identify factors influencing their expressiveness.

Key words: reproductive disorders, chromosomal abnormalities, spermatogenesis.

ЛИТЕРАТУРА

1. Ворсанова С.В., Юров Ю.Г., Соловьев И.В., Демидова И.А. и др. Современные методы молекулярной диагностики хромосомной патологии // Клиническая лабораторная диагностика. – 2000. – № 8. – С. 36–39.
2. Ворсанова С.В., Юров Ю.Г., Чернышов В.Н. Хромосомные синдромы и аномалии. – Ростов-на Дону. – 1999. – С. 155–156.
3. Ворсанова С.В., Юров Ю.Г., Чернышов В.Н. Медицинская цитогенетика. – М., 2006. – С. 219–222.
4. Глинкина Ж.Т. Комплексное генетическое обследование мужчин: программа ИКСИ // Гинекология, Том 08/Н, М., 2006. – С. 28–30.
5. Зерова-Любимова Т.Е., Горovenko Н.Г. Стандарты анализа препаратов хромосом человека (методические рекомендации). – К., 2003. – С. 10.
6. Курило Л.Ф., Шаповал Н.В., Дубинская В.П. и др. Структура хромосомной патологии среди пациентов с нарушением репродуктивной системы. Тез. докл. 1 (3) Рос. съезда мед. генетиков. – М., 1994; 1: 85–86.
7. Курило Л.Ф., Шилейко Л.Ф., Мхитарова Е.В. и др. Структура наследственной патологии половой системы при обследовании пациентов с нарушением репродукции: Тезисы конференции «Наследственные заболевания», МГНЦ РАМН, М., XI 1997.
8. Carrell D. // J Andrology, 2008, 29:124–133.
9. Johnson MD. Genetic risks of intracytoplasmic sperm injection in the treatment of male infertility: recommendations for genetic counseling and screening. Fertil Steril, 1998, Sep; 70(3): 397–411.
10. Rossato M. et al. High fertilization rate in conventional in vitro fertilization utilizing spermatozoa from an oligozoospermic subject presenting microdeletions of the Y chromosome long arm. Mol Hum Reprod 1998; 4: 473–476.
11. Simoni M., Bakker E., Eurlings M. et al. Laboratory guidelines for molecular diagnosis of Y-chromosomal microdeletions // Int J Androl 1999; 22: 292–299.
12. Tempest HG, Martin RH. Cytogenetic risks in chromosomally normal infertile men. Curr Opin Obstet. Gynecol. 2000 Jun; 21(3): 223–7.
13. Tiepolo L., Zuffardi O. Localisation of factors controlling spermatogenesis in nonfluorescent portion of the human chromosome Y long arm. Hum Genet 1976; 34: 119–124.
14. Vincent MC, Daudin M, De MP et al. Cytogenetic investigations of infertile men with low sperm counts: a 25-year experience // J Androl, 2002 Jan–Feb; 23(1): 18–22.