

ГАЙБОНЮК І.Є., ТИРКУС М.Я., МАКУХ Г.В.✉

ДУ «Інститут спадкової патології НАМН України»,

Україна, 79000, м. Львів, вул. Лисенка, 31а, e-mail: makukh.h@ihp.lviv.ua

✉ makukh.h@ihp.lviv.ua

ЧАСТОТА ТЕРМІНАЛЬНОЇ ДЕЛЕЦІЇ sY160 СЕРЕД ЧОЛОВІКІВ ІЗ МІКРОДЕЛЕЦІЯМИ AZFc РЕГІОНУ Y-ХРОМОСОМИ

Сперматогенез – складний багатостадійний процес, у контроль, регуляцію і реалізацію якого залучено більше 2000 генів, серед яких центральне місце займають гени Y-хромосоми. Результати молекулярно-генетичних досліджень свідчать про те, що мікрodelеції AZF локусу є однією з найбільш поширених генетичних причин непліддя у чоловіків при важких формах порушення сперматогенезу. Зокрема, на довгому плечі Y-хромосоми (Yq) в проксимальній еухроматиновій її ділянці містяться гени фактора азооспермії (AZF-регіон), які відповідають за нормальний сперматогенез. Делеції AZF-регіону супроводжується важкими порушенням фертильності [1].

Уперше роль делецій локусу Yq11 в етіології порушення процесів сперматогенезу було показано в 1976 р. Tiepolo і Zuffardi [2]. За допомогою Sts-технології побудовано детальну карту Y-хромосоми, що включає 43 делеційні інтервали, та підтверджено наявність у дистальній ділянці довгого плеча Y-хромосоми локусу AZF, делеції якого супроводжуються порушеннями процесів сперматогенезу та чоловічим непліддям [3]. Так, при таких важких формах порушення сперматогенезу, як азооспермія та олігозооспермія, мікрodelеції AZF локусу Y-хромосоми виявляють у 5–15 % обстежених, причому частота мікрodelецій зростає в міру поглиблення порушень процесів сперматогенезу: мікрodelеції AZF локусу Y-хромосоми виявлені у 5–10 % чоловіків з олігозооспермією, у чоловіків з азооспермією цей показник сягає 10–15 % [4, 5].

У 1996 р. Р. Н. Vogt із співавт. [6] на основі одержаних даних про локалізацію та розмір делецій запропонували виділити в локусі Yq11.21-q11.23 три субрегіони: AZFa, AZFb і AZFc. Делеції AZF регіону можуть бути повними, які видаляють один або більше AZF регіонів, та частковими, які не повністю захоплюють будь-який із трьох регіонів. Найбільш частим

типом повних (класичних) AZF делецій є повні AZFc (b2/b4) делеції, частка яких складає 65–70 % від усіх AZF делецій. Друге місце за частотою (15–20 %) займають делеції, які захоплюють регіони AZFc і/або AZFb (AZFb+c і AZFb делеції). Найбільш рідко (5–10 %) виявляють делеції AZFa регіону. Найважчими є мікрodelеції, що захоплюють субрегіони AZFa і AZFb. У таких випадках майже неможливе отримання зрілих сперматозоїдів. Делеції регіону AZFc виявляються у неплідних чоловіків значно частіше, і у 50–70 % випадках є можливість отримати сперматозоїди при біопсії яєчка [7–9]. Вірогідність успішного проведення лікування непліддя у них методом ІКСІ достатньо висока.

За даними літератури, важливим критерієм для рекомендації застосування ІКСІ для осіб із мікрodelеціями AZFc регіону є присутність на Y-хромосомі маркера термінальної делеції sY160. Він локалізований на Y-специфічній повторюваній послідовності ДНК – DAZ2. Результати досліджень показали, що ці повтори не обмежуються лише дистальним кінцем Yq12, а проходять через усю довжину гетерохроматинової ділянки [14]. За наявності цього фрагмента шанси на позитивний результат ІКСІ сягають до 50 %. Відсутність маркера sY160 (термінальна делеція) вважається несприятливим прогностичним чинником для отримання сперматозоїдів при біопсії яєчка й шанси на позитивний результат ІКСІ мінімальні [10, 11].

Метою роботи було встановити частоту термінальної делеції sY160 Y-хромосоми серед чоловіків із мікрodelеціями AZFc регіону.

Матеріали і методи

Молекулярно-генетичне дослідження мікрodelецій Y-хромосоми проведено у 1500 осіб. Обстежувані скеровувалися у Львівський міжобласний медико-генетичний центр з при-

воду неплідного шлюбу. Вік пацієнтів складав від 25 до 43 років. Слід наголосити, що всі обстежувані індивіди є вихідцями і проживають на території Західної України. За результатами клінічного аналізу досліджуваної групи неплідних чоловіків встановлено широкий спектр порушень процесів сперматогенезу. Всі обстежувані чоловіки мали багаторічне непліддя незрозумілого генезу, а показники спермограмми практично не піддавалися корекції.

Молекулярно-генетичне дослідження термінальної делеції sY160 проведено у 47 осіб із мікроделеціями AZFc та AZF (b+c) регіонів Y-хромосоми.

Проводили виділення та очищення ДНК з лейкоцитів периферійної крові методом висолювання [12]. Наявність гена SRY та мікроделеції AZF регіону Y-хромосоми визначали за допомогою двох мультилокусних ПЛР, у кожній із яких ампліфікували фрагменти трьох AZF (AZFa, AZFb та AZFc) регіонів, ген SRY. Досліджували мікроделеції Y хромосоми AZF регіону в таких STS локусах: sY14, sY84, sY86, sY127, sY134, sY254, sY255 [13]. Наявність термінальної делеції sY160 визначали за допомогою мультилокусної ПЛР [10].

ПЛР проводили в автоматичному режимі на термоциклері «Терцик» («ДНК-технологія», Росія), використовували олігонуклеотидні праймери та суміш dDNTF («Fermentas», Вільнюс, Литва), п'ятикратний реакційний буфер «AmpliSens» (Росія) та термостабільну Dream-Taq-полімераза виробництва фірми ThermoScientific, Америка.

Для детекції маркера термінальної делеції sY160 проводили аель-специфічну ПЛР в автоматичному режимі на термоциклері «Терцик». У роботі використовували 2xPCR MM, деіонізовану воду (ThermoScientific, США) та олігонуклеотидні праймери.

Продукти ампліфікації візуалізували шляхом проведення електрофорезу в 2 % агарозному гелі, який містив бромистий етидій, та сканували на ультрафіолетовому транслюмінаторі «ЕСХ-15. М» (VILBER LOURMAT, Франція). Одержані сигнали порівнювали з маркерами довжин і на основі цього детектували розміри одержаних фрагментів. Результати сканування агарозних гелів знімали цифровою камерою «Gel Imager» (HELICON, Росія). Обробку зображень здійснювали на комп'ютері за допомогою програм Adobe Photoshop CS та Gel Explorer 2.0.

Результати та обговорення

Молекулярно-генетичне дослідження мікроделецій Y-хромосоми AZF-регіону в ділянках AZFa, AZFb та AZFc із використанням ДНК-аналізу проведено в таких STS локусах: sY84, sY86, sY127, sY134, sY254, sY255. Відсутність на електрофореграмі певних фрагментів свідчила про наявність мікроделецій у відповідних локусах. Електрофореграми молекулярно-генетичного дослідження мікроделецій Y хромосоми наведено на рис. 1.

У 102 пацієнтів виявлено мікроделеції Y-хромосоми, що складає 7 % від усіх (1500) обстежених чоловіків. При цьому виявлений такий спектр мутацій: мікроделеції субрегіону AZFa виявлено у однієї особи (1 %), субрегіону AZFb – у трьох осіб (3 %), субрегіонів AZF(b+c) – у 15 осіб (14,7 %), мікроделеції субрегіону AZFc виявлено у 67 осіб (65,7 %), у 16 осіб встановлено відсутність усієї послідовності AZF(a+b+c) Y-хромосоми (15,6 %). У пацієнта з мікроделецією AZFb діагностовано азооспермію. У двох осіб з мікроделеціями AZFb регіону, крім відсутності сперматозоїдів в еякуляті були також відсутні клітини сперматогенезу (аспермія) при нормальному каріотипі. Мікроделеції регіонів AZF(b+c) (sY127, sY134, sY254, sY255) виявлено в чоловіків, у яких було діагностовано аспермію та азооспермію.

Мікроделеції регіону AZFc (sY254, sY255) виявлено у 67 осіб, у яких кількість сперматозоїдів в еякуляті варіювала від повної їх відсутності до 10 млн/мл. У цих осіб діагностовано аспермію, азооспермію, олігозооспермію, олігоастенотератозооспермію IV ст. і в одного пацієнта – помірну олігоастенотератозооспермію (кількість сперматозоїдів 10 млн/мл). Усі пацієнти з мікроделеціями AZFc мали нормальний каріотип (46,XY).

Протяжну делецію регіону AZF(a+b+c) (sY84, sY86, sY127, sY134, sY254, sY255) виявлено у 16 осіб. Що до гена SRY, то в 11 осіб він присутній, а у 5 пацієнтів відсутній. У пацієнтів, за даними спермологічних досліджень, діагностували аспермію – відсутність сперматозоїдів та клітин сперматогенезу. При проведенні цитогенетичного аналізу у пацієнтів із протяжною делецією AZF(a+b+c) було встановлено каріотип 46,XX (синдром де ля Шапеля).

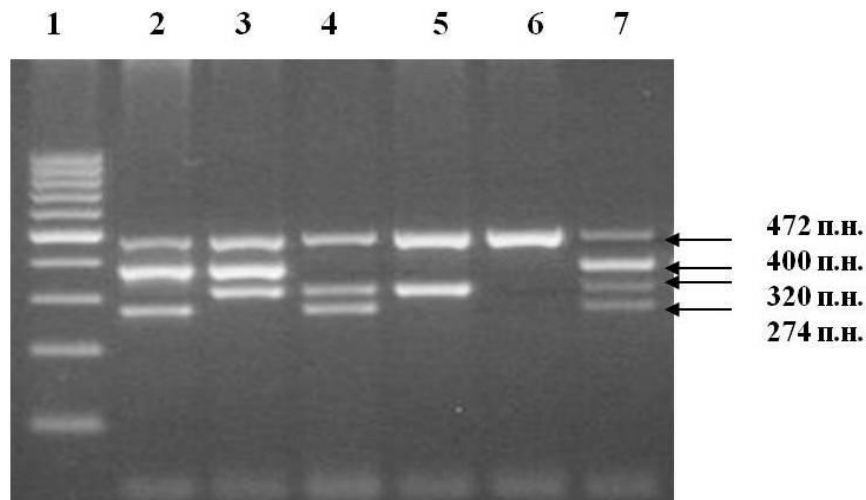


Рис. 1. Електрофореграми мультилокусних ПЛР реакцій (2 % агарозний гель): 1 – маркери молекулярної ваги (Ladder 100 bp); 2 – ДНК індивіда з мікрделецією AZFa регіону; 3 – ДНК індивіда з мікрделецією AZFb регіону; 4 – ДНК індивіда з мікрделецією AZFc регіону; 5 – ДНК індивіда з мікрделецією AZFb+c регіонів; 6 – ДНК індивіда з мікрделецією AZFa+b+c регіонів; 7 – ДНК фертильного індивіда.

Слід наголосити, що переважна більшість порушень, описаних вище, утворюється *de novo*. Причини їх утворення невідомі, але, водночас, вони мають тенденцію до закріплення у подальших поколіннях. Це необхідно враховувати, рекомендуючи застосування додаткових репродукційних технологій. За даними літератури, важливим критерієм для рекомендації застосування ICSI для осіб з мікрделеціями AZFc регіону є присутність на Y-хромосомі термінальної делеції sY160. Тому видавалося важливим провести молекулярно-генетичне дослідження термінальної делеції sY160 серед

осіб із мікрделеціями AZFc та AZF(b+c) регіонів Y-хромосоми.

Як контроль було взято один зразок жінки, один зразок ДНК фертильного чоловіка без мікрделецій AZF регіону та негативний контроль. Електрофореграму молекулярно-генетично дослідження маркера термінальної делеції sY160 наведено на рис. 2.

У результаті проведення ПЛР аналізу в 39 осіб було виявлено присутність маркера термінальної делеції sY160, що складає 84,8 %. У 7 осіб детектували відсутність локусу sY160, що становить 15,2 %. Результати цього дослідження наведені у таблиці 1.

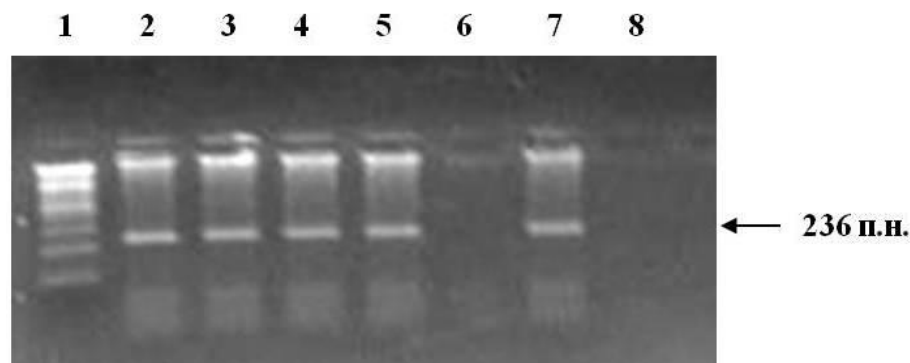


Рис. 2. Електрофореграма алель-специфічної ПЛР реакції (2 % агарозний гель): 1 – маркери молекулярної ваги (Ladder 100 bp); 2–5, 7 – ДНК особи з наявним маркером термінальної делеції sY160; 6 – ДНК особи з відсутністю маркера термінальної делеції sY160; 8 – ДНК особи жіночої статі.

Таблиця 1. Частота детекції маркера термінальної делеції sY160 серед чоловіків із різними типами AZF мікрodelецій

Тип мікрodelецій	n, (%)	sY160	
		Присутній	Відсутній (термінальна делеція)
		n, (%)	n, (%)
AZFa	0	0	0
AZFb	1, (2,2)	1, (100)	0
AZFb + AZFc	6, (13,0)	1, (16,7)	5, (83,3)
AZFc	39, (84,8)	37, (94,9)	2, (5,1)
Всі типи	46, (100)	39, (84,8)	7, (15,2)

Відсутність маркера термінальної делеції виявили у 2 осіб із мікрodelецією AZFc регіону та у 5 осіб із мікрodelецією AZFb+c.

Генофенотиповий аналіз показав у осіб

досліджуваної групи такі порушення сперматогенезу: аспермії, азооспермії, астенозооспермії, олігозооспермії та оліготератозооспермії. Дані наведено в табл. 2

Таблиця 2. Типи порушень сперматогенезу в осіб досліджуваної групи

Тип мікрodelецій	Тип порушення сперматогенезу	
	Присутній sY160	Термінальна делеція
AZFb	аспермія	-
AZFb + AZFc	аспермія	аспермія
AZFc	Азооспермія, аспермія олігоастенотератозооспермія	аспермія, олігоастенотератозооспермія

Як свідчать дані, наведені в таблиці 2, не встановлено чітких асоціацій між типом порушення сперматогенезу та присутністю sY160 чи термінальною делецією цього локусу. Такі результати вказують на те, що результати детекції локусу sY160 є важливим чинником прогнозування шансів застосування допоміжних репродуктивних технологій, незважаючи на діагностований тип порушення сперматогенезу.

Отримані результати показали, що у 37 осіб, що складають 94,9 % обстежених, можна отримати сперматозоїди, що є сприятливим прогностичним фактором для застосування допоміжних репродуктивних технологій. Згідно з даними літератури, термінальну делецію частіше виявляють у чоловіків із мозаїчним каріотипом 45,X[10]/46,XY, за якого є більший ризик анеуплоїдії у потомства [9]. У цій роботі було виявлено один такий випадок. Особа є носієм делеції, яка захоплює регіони AZFc і AZFb (AZFb+c делеція). У чоловіка також відсутній гетерохроматиновий маркер термінальної делеції sY160, що відповідає даним літератури [15].

Отже, у 15,2 % осіб з мікрodelеціями AZF регіону Y-хромосоми був відсутній гетерохроматиновий маркер sY160 – термінальна делеція.

Частіше його відсутність виявлялася в осіб із делеціями AZFb+c регіонів (83,3 %), ніж в осіб із мікрodelеціями AZFc регіону (5,1 %). Дослідження присутності/відсутності маркера термінальної делеції дозволяє встановити, чи перебудова відповідає типу AZFc b2/b4, і уникнути інвазивного втручання в осіб із мікрodelеціями, для яких вона не буде ефективною.

Висновки

1. Серед усіх обстежених інфертильних чоловіків частота мікрodelецій Y-хромосоми становить 7 %. Мікрodelеції субрегіонів AZFa та AZFb траплялися лише у пацієнтів з аспермією та азооспермією. Найчастіше виявляли мікрodelеції AZFc регіону (65,7 %) у чоловіків із порушеннями процесів сперматогенезу різного ступеня важкості.

2. У 15,2 % осіб із мікрodelеціями AZF регіону Y-хромосоми був відсутній гетерохроматиновий маркер sY160 – термінальна делеція.

3. Відсутність локусу sY160 частіше виявляли в осіб із делеціями AZFb+c регіонів (83,3 %), ніж в осіб із мікрodelеціями AZFc регіону (5,1 %). Дослідження присутності/відсутності маркера термінальної делеції дозволяє

встановити, чи перебудова відповідає типу осіб із мікроделеціями, для яких вона не буде AZFc b2/b4, і уникнути інвазивного втручання в ефективною.

Література

1. Hopps C.V., Mielni A., Goldstein M., Palerm G.D., Rosenwaks Z., Schlegel P.N. Detection of sperm in men with Y chromosome microdeletions of the AZFa, AZFb and AZFc regions // *Human Reproduction*. – 2003. – V. 18. – P. 1660–1665.
2. Tiepolo L., Zuffardi O. Localization of factors controlling spermatogenesis in the nonfluorescent portion of the human Y-chromosome long arm // *Hum.Genet.* – 1976. – V. 34. – P. 119–124.
3. Vollrath D., Foote S., Hilton A., Brown L.G., Beer-Romero P., Bogan J.S., Page D.C. The human Y chromosome: a 43-internal map based on naturally occurring deletions // *Science*. – 1992. – V. 258. – P. 52–59.
4. Foresta C., Moro E., Ferlin A. Prognostic value of Y deletion analysis. The role of current methods // *Hum. Reprod.* – 2001. – V. 16, № 8. – P. 1543–1547.
5. Simoni M., Bakker E., Eurlings M., Matthijs G., Moro E., Muller C.R., Vogt P.H. Laboratory guidelines for molecular diagnosis of Y-chromosomal microdeletion // *Int. J. Androl.* – 1999. – V. 22. – P. 292–299.
6. Vogt P.H., Edelmann A., Kirsch S., Henegariu O., Hirschmann P., Kiesewetter, Köhn F.M., Schill W.B. Human Y chromosome azoospermia factors (AZF) mapped to different subregions in Yq11 // *Hum Mol Genet.* – 1996. – V. 5. – P. 933–943.
7. Krausz C., Quintana-Murci L., McElreavey K. Prognostic value of Y deletion analysis: what is the clinical prognostic value of Y chromosome microdeletion analysis? // *Human Reproduction*. – 2000. – V. 15. – P. 1431–1434.
8. Calogero A.E., Garofalo M.R., Barone N. Spontaneous regression over time of the germinal epithelium in a Y chromosome-microdeleted patient // *Human Reproduction*. – 2001. – V. 16. – P. 1845–1848.
9. Krausz C., Forti G., McElreavey K. The Y chromosome and male fertility and infertility // *International Journal of Andrology*. – 2003. – V. 26. – p. 70–75.
10. Krausz C., Hoefsloot L., Simoni M., Tüttelmann F. EAA/EMQN best practice guidelines for molecular diagnosis of Y-chromosomal microdeletions: state-of-the-art 2013 // *Andrology*. – 2014. – V. 2, № 1. – P. 5–19.
11. Ambulkar P.S., Sigh R., Reddy M., Varma P.S., Gupta D.O., Shende M.R., Pal A.K. Genetic Risk of Azoospermia Factor (AZF) Microdeletions in Idiopathic Cases of Azoospermia and Oligozoospermia in Central Indian Population // *J Clin Diagn Res.* – 2014. – V. 8, № 3. – P. 88–91.
12. Макух Г.В., Заставна Д.В., Тиркус М.Я. Пат. 32044 UA, МПК G01N33/49 (2006.01) Спосіб виділення ДНК з лейкоцитів периферійної крові, заявник ДУ «Інститут спадкової патології АМНУ». – № u200801896; заявл. 14.02.2008; опубл. 25.04.2008, Бюл. № 8.
13. Simoni M., Bakker E., Krausz C. EAA/EMQN best practice guidelines for molecular diagnosis of y-chromosomal microdeletions // *International J. of Andrologi.* – 2004. – V. 27. – P. 240–249.
14. Brandell R.A., Mielnik A., Liotta D., Ye Z., Veeck L.L., Palermo G.D. AZFb deletions predict the absence of spermatozoa with testicular sperm extraction: preliminary report of a prognostic genetic test // *Hum Reprod.* – 1998. – V. 13. – P. 2812–2815.
15. Jaruzelska J., Korcz A., Wojda A., Jedrzejczak P., Bierla J., Surmacz T., Page D., Kotecki M. Mosaicism for 45,X cell line may accentuate the severity of spermatogenic defects in men with AZFc deletion // *International J of Andrologi.* – 2001. – V. 38. – P. 798–802.

HAIBONIUK I.Y., TYRKUS M.Ya., MAKUKH H.V.

Institute of Hereditary Pathology of the Ukrainian National Academy of Medical Sciences, Ukraine, 79000, Lviv, Lysenko str., 31-a, e-mail: makukh.h@ihp.lviv.ua

THE FREQUENCY OF TERMINAL DELETIONS sY160 AMONG MEN WITH MICRODELETIONS OF AZFc REGION Y-CHROMOSOME

Aim. Determine the frequency of absence marker terminal deletions sY160 among men with microdeletions of AZFc region Y-chromosome. **Methods.** DNA from probands blood samples was isolated using a modified salting out method. Microdeletions of Y chromosome AZF region were analyzed using two multiplex PCR. The molecular-genetic study of terminal deletions (absence of sY160) was carried out using allele-specific PCR and analysed by electrophoresis in a 2 % agarose gel. **Results.** Among infertile men (1500 individuals), Y chromosome microdeletions were detected in 7% males: microdeletions of AZFa subregion in 1 %, AZFb subregion – 3 %, AZF(b+c) subregions – 15 %, AZFc subregion – 67 %. The presence of heterochromatin marker sY160 was confirmed in 39 cases (84.8 %) and absence of sY160 in 7 men (15.2 %). Absence of sY160 was detected in 2 men with AZFc microdeletion and in 5 men with AZFb+AZFc microdeletions. It is important to point out that terminal AZFc deletion was confirmed in 83.3 % of cases of AZFb+c microdeletions and only in 5.1 % of isolated AZFc microdeletions. **Conclusions.** Thus, among 15.2 % man with different AZF microdeletions of Y-chromosome the heterochromatin marker of terminal deletion sY160 was absent. The implementation of testing of marker of terminal deletion – sY160 may help to determine if the deletion corresponds to the b2/b4 pattern and to avoid biopsy in man which most likely not benefit from the surgical procedure.

Keywords: male infertility, spermatogenesis, Y chromosome, AZF region, terminal deletions.