

# Анализ микроделений AZF локуса Y хромосомы у мужчин с бесплодием

**А.Ч. Усунбаев<sup>1</sup>, Б.А. Рысбаев<sup>1</sup>, К.Н. Стамбекова<sup>1</sup>, Р.А. Джандралиев<sup>2</sup>**

<sup>1</sup> Кафедра урологии и андрологии до- и последипломного обучения Кыргызской государственной медицинской академии им. И. К. Ахунбаева; Кыргызская Республика

<sup>2</sup> Кыргызский научный центр репродукции человека, Кыргызская Республика

## Сведения об авторах:

Усунбаев А.Ч. – д.м.н., профессор, заведующий кафедрой урологии и андрологии до-и последипломного обучения КГМА им. И.К. Ахунбаева, akylbekusupbaev@rambler.ru

Usupbaev A.Ch. – Dr. Sc., professor, head of Pre- and Postgraduate Training Department of Urology and Andrology, I.K.Akhunbaev Kyrgyz State Medical Academy, akylbekusupbaev@rambler.ru

Рысбаев Б.А. – к.м.н., доцент кафедры урологии и андрологии до-и последипломного обучения КГМА им. И.К. Ахунбаева, brysbaev@gmail.com

Rysbaev B.A. – PhD, associate professor of Pre- and Postgraduate Training Department of Urology and Andrology, I.K.Akhunbaev Kyrgyz State Medical Academy, brysbaev@gmail.com

Стамбекова К.Н. – к.м.н., доцент кафедры урологии и андрологии до-и последипломного обучения КГМА им. И.К. Ахунбаева, kana7171@mail.ru

Stambekova K.N. – PhD, associate professor of Pre- and Postgraduate Training Department of Urology and Andrology, I.K.Akhunbaev Kyrgyz State Medical Academy, kana7171@mail.ru

Джандралиев Р.А. – м.н.с. Кыргызского научного центра репродукции человека, raketka2005@rambler.ru

Jandraliev R.A. – Junior Researcher Kyrgyz Research Center for Human Reproduction, raketka2005@rambler.ru

**В** современном мире бесплодие представляет собой важную медико-социальную проблему, затрагивающую демографические основы общества. Бесплодием страдают около 15% супружеских пар, при этом, неуклонно растет доля мужского фактора и по данным Европейской ассоциации урологов она в настоящее время составляет около 50% [1]. Приблизительно у 5% мужчин репродуктивного возраста имеются различные количественные и качественные изменения спермы. Около 1/3 случаев мужского бесплодия относят к так называемому идиопатическому типу бесплодия, большинство случаев которого может быть обусловлено генетическими факторами, такими как различные нарушения хромосом или мутации в ответственных за сперматогенез генах [2,3].

Результаты многочисленных исследований, посвященных изучению роли генетических факторов в этиологии бесплодия, убедительно доказывают ведущее место данных факторов в структуре нарушений репродуктивной функции как у мужчин, так и у женщин [4,5]. Так, генетические факторы обуславливают, по крайней мере, 30-50% всех случаев тяжелых форм бесплодия у

мужчин. Помимо аномалий карио-типа наиболее частой генетической причиной бесплодия у мужчин являются делеции Y-хромосомы, захватывающие локус AZF. Распространенность данной мутации среди мужчин с выраженными отклонениями в показателях спермограммы широко варьирует в различных популяциях и составляет в среднем 7,6% [6,7].

Делеции AZF-локуса связаны с различной степенью нарушения сперматогенеза от умеренного снижения его активности (гипосперматогенез) или блока сперматогенеза до практически полного отсутствия половых клеток в семенных канальцах – Сертоли клеточный синдром (СКС) [4-6, 8-12].

Азооспермия и олигозооспермия тяжелой степени являются одними из наиболее тяжелых форм нарушения сперматогенеза и составляют 10-20% и 15-20%, соответственно, от всех нарушений репродуктивной функции у мужчин при измененных показателях спермограммы. С помощью имеющихся в настоящее время методов цитогенетической и молекулярно-генетической диагностики макро- и микроделении Y-хромосомы, захватывающие локус AZF, удается обнаружить у 10-15% мужчин с азооспермией и

у 5-10% мужчин с олигозооспермией тяжелой степени [5-8,11-15].

Впервые роль делеций локуса Yq11 в этиологии нарушения сперматогенеза и бесплодия у мужчин была показана в 1976 г. L. Tierolo и O. Zuffardi [16]. Дальнейшие цитогенетические и молекулярно-генетические исследования позволили с помощью STS-технологии (sequence-tagged sites) построить детальную карту Y-хромосомы, включающую 43 делеционных интервала [17]. Было подтверждено наличие в дистальной части длинного плеча Y-хромосомы локуса AZF, делеции которого ответственны за нарушение сперматогенеза. В 1996 г. P.H. Vogt и соавт. на основе полученных данных о локализации и размере делеций, выявленных у 26 мужчин, предложили выделить в локусе Yq11.21-q11.23 три неперекрывающихся субрегиона: AZFa, AZFb и AZFc [18].

Целью нашего исследования явилось уточнение структуры и определение роли генетических нарушений при бесплодии.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

За период с 2017 по 2018 гг. было обследовано 63 пациента с первичным бесплодием. На основа-

нии результатов спермиологического исследования мужчин с бесплодием разделили на 2 группы: группу с азооспермией и контрольную группу (табл. 1). В группу с азооспермией были включены 63 пациента, контрольную группу составили 30 здоровых (фертильных) мужчин.

Обследование, проведенное пациентам, включало общеклиническое, общее и специальное андрологическое исследование, сперматологическое (стандартное спермиологическое исследование, в некоторых случаях – гистологическое исследование биоптата яичка), молекулярно-генетическое исследование (анализ микроделений Y-хромосомы).

Спермиологический анализ эякулята выполняли по стандартной методике, рекомендованной ВОЗ [19]. Гистологическое исследование биоптата яичка проводилось путем цитогистологического анализа [9].

Полимеразную цепную реакцию (ПЦР) выполняли на программируемом термоциклере МС2 производства фирмы «ДНК-технология» (Россия) с использованием Taq-полимераз.

Анализ микроделений локуса AZF был проведен в соответствии с руководством по молекулярной диагностике микроделений Y-хромосомы [12]. Для обнаружения деле-

ций применяли мультиплексную амплификацию (МПА), предложенную в данном руководстве в собственной модификации. На первом этапе анализа выполняли детектирование делеций в трех субрегионах AZF.

### РЕЗУЛЬТАТЫ

Среди 63 обследованных мужчин кыргызов с бесплодием делеции локуса AZF были обнаружены у 7 (11,1%) пациентов (табл. 1). Делеции Y-хромосомы были выявлены только у пациентов с азооспермией. Ни одной Y-делеции не было обнаружено у фертильных мужчин контрольной группы. Чаще всего делеции располагались в AZFc-субрегионе (57,1% делеций Y-хромосомы) (табл. 2). Микроделения субрегиона AZFb были выявлены только у двух пациентов (28,6 % случаев от всех обнаруженных делеций локуса AZF) и у одного пациента выявлена микроделеция AZFa+b+c – субрегиона (14,3% случаев).

Спермиологическая и гистологическая картина, обнаруженная нами у мужчин с делециями локуса AZF, выявляла различную степень нарушений сперматогенеза. У обоих пациентов с микроделениями AZFb-субрегиона отмечали азооспермию. Гистологическое исследование биоптата яичка, проведенное у одного

из них, позволило выявить синдром клеток Сертоли. По результатам молекулярного анализа у этих пациентов область делеции захватывала маркер sY1197 субрегиона AZFb. У мужчин с делециями субрегиона AZFc сперматозоиды отсутствовали (азооспермия). При анализе гистопрепаратов биоптата яичка, выполненного у двух из этих пациентов, было установлено, что у одного из них половые клетки отсутствовали в большинстве семенных канальцев.

### ОБСУЖДЕНИЕ

Частота обнаружения микроделений Y-хромосомы среди мужчин с бесплодием значительно варьирует в различных исследованиях (от 1% до 35%) [7,8,10,20]. Широкий разброс частот выявляемости делеций обусловлен влиянием ряда факторов, среди которых наибольшее значение имеют критерии отбора пациентов для проведения микроделеционного анализа. В среднем выявлено наличие делеций локуса AZF у 7,5% мужчин с бесплодием, при этом наибольшая частота делеций отмечена среди мужчин с идиопатической азооспермией (18%) или тяжелой олигозооспермией неясного генеза (14,3%) [9]. Количество делеций, выявленных по результатам нашего исследования, в общем аналогично частоте встречаемости делеций отдельных субрегионов или захватывающих несколько регионов, а также аналогично средней частоте встречаемости микроделений в азиатских популяциях [20]. При этом соотношение между различными типами выявленных нами делеций в целом отражает структуру делеционных нарушений в локусе AZF у мужчин с бесплодием.

При делециях, захватывающих субрегионы AZFb и AZFc, у мужчин выявляются азооспермия и СКС. Определение зависимости степени нарушения сперматогенеза от размера и локализации делеций может иметь прогностическое значение [12].

Таблица 1. Частота делеций локуса AZF в обследованных группах мужчин

№	Группы пациентов	Количество обследованных мужчин	Число обнаруженных делеций AZF- локуса
1	Пациенты с азооспермией	63	7 (11,1%)
2	Контрольная группа	30	0 (0%)

Таблица 2. Количество обнаруженных микроделений AZF локуса длинного плеча Y-хромосомы

Характер нарушения	n	%
Общее количество обнаруженных делеций AZF-локуса	7	100
Микроделения AZFb-субрегиона	2	28,6
Микроделения AZFc -субрегиона	4	57,1
Микроделения AZFa+b+c – субрегиона	1	14,3

для возможного получения сперматозоидов, пригодных для проведения ICSI (Intra Cytoplasmic Sperm Injection) – инъекцией сперматозоида в цитоплазму ооцита [5,8,11]. Наличие делеций, захватывающих субрегионы AZFa или AZFb, указывает на невозможность получения зрелых половых клеток, а у пациентов с делециями AZFc при биопсии яичка примерно в 50-70 % случаев удается получить зрелые сперматозоиды [5,11].

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Результаты многочисленных исследований микроделечий Y-хромо-

сомы у мужчин с бесплодием, а также оценка роли генов локуса AZF в дифференцировке и развитии мужских половых клеток убедительно свидетельствуют о высокой значимости генов Y-хромосомы в контроле сперматогенеза у человека. У специалистов в области генетики, андрологии, репродуктивной медицины произошло осознание того, что азооспермия является одной из наиболее распространенных причин бесплодия у мужчин, и исследование микроделечий Y-хромосомы широко вошло в практику. Молекулярно-генетический анализ Y-хромосомы на наличие классических микроделечий должен быть рекомендован всем мужчинам с

азооспермией или олигозооспермией тяжелой степени.

Исследование микроделечий AZF локуса Y-хромосомы у мужчин с тяжелой формой олигозооспермии и азооспермии позволяет установить генетическую причину нарушения сперматогенеза и является важным диагностическим и прогностическим критерием, определяющим рациональную тактику лечения, выбор метода преодоления бесплодия, а также прогнозировать вероятность получения сперматозоидов для проведения экстракорпорального оплодотворения, в частности интрацитоплазматической инъекции сперматозоида в ооцит. ■

**Ключевые слова:** мужское бесплодие, делеции AZF локуса.

**Key words:** male infertility, deletion of AZF locus.

### Резюме:

**Введение.** Одной из наиболее частых генетических причин бесплодия у мужчин являются делеции в локусе AZF, локализованном на длинном плече Y-хромосомы (Yq11), которые приводят к различной степени нарушения сперматогенеза, от сниженной его активности до синдрома клеток Сертоли, проявляясь чаще всего азооспермией или олигозооспермией тяжелой степени.

**Материалы и методы.** При клинико-генетическом обследовании 63 мужчин кыргызов с бесплодием проведен анализ микроделечий в локусе AZF. В 7 случаях выявлены делеции Y-хромосомы: 2 микроделечии AZFb, 4 микроделечии в субрегионе AZFc и 1 микроделечия в субрегионе AZFa+b+c. Обследование, проведенное пациентам, включало общеклиническое, общее и специальное андрологическое исследование, сперматологическое (стандартное спермиологическое исследование, в некоторых случаях – гистологическое исследование биоптата яичка), молекулярно-генетическое исследование (анализ микроделечий Y-хромосомы).

**Результаты и обсуждение.** Частота обнаружения микроделечий Y-хромосомы среди мужчин с бесплодием значительно варьирует в различных исследованиях (от 1% до 35%). Широкий разброс частот делеций обусловлен влиянием ряда факторов, среди которых наибольшее значение имеют критерии отбора пациентов для проведения микроделечийного анализа, в среднем выявлено наличие делеций локуса AZF у 7,5% мужчин с бесплодием, при этом наибольшая частота делеций отмечена среди мужчин с идиопатической азооспермией (18%) или тяжелой олигозооспермией неясного генеза (14,3%). Количество делеций, полученной в результате исследования, в общем сходна с картиной встречаемости делеций отдельных субрегионов или захватывающих несколько регионов, а также сходна по частоте микроделечий в среднем встречающихся в азиатских популяциях. При этом соотношение между различными типами выявленных нами делеций в целом отражает структуру делеционных нарушений в локусе AZF у мужчин с бесплодием.

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

### Summary:

#### Microdeletion analysis of the AZF locus of the chromosome Y in infertile males

A.Ch. Usupbaev, B.A. Rysbaev, K.N. Stambekova, R.A. Jandraliev

**Introduction.** One of the major genetic causes male infertility are deletions in AZF locus (Yq11) that associated with various spermatogenesis abnormalities from hypospermatogenesis to «Sertoli cells only syndrome», appearing mostly azoospermia or severe oligozoospermia.

**Materials and methods.** At the clinical and genetic examination of 63 infertile kyrgyz males microdeletion analysis of AZF locus was performed. Y-chromosome deletions were founded in 7 cases: two AZFb-microdeletions, four microdeletion in AZFc-subregion and one microdeletion in AZFa+b+c-subregion. The examination of patients included common clinical, general and special andrological study, a spermatological (standard spermiological study, in some cases a histological examination of the testicular biopsy), a molecular genetic study (analysis of Y chromosome microdeletions).

**Conclusion.** The frequency detection microdeletions Y-chromosome among infertile men varies considerably in different studies (from 1% to 35%). A wide spread of deletion frequencies is due to the influence of a number of factors, among which the most important are the criteria for selecting patients for microdeletion analysis, on average, the presence of AZF-locus deletions in 7.5% of men with infertility was revealed, with the highest frequency of deletions among men with idiopathic azoospermia (18%) or severe oligozoospermia of unknown origin (14.3%). The amount of deletions obtained from the study is generally similar to the pattern of deletions occurring in individual subregions or in several exciting regions, as well as similar in the frequency of microdeletions occurring on average in Asian populations. At the same time, the ratio between different types of deletions revealed by us generally reflects the structure of deletion disorders in AZF locus in men with infertility.

Authors declare lack of the possible conflicts of interests.

## ЛИТЕРАТУРА

- Jungwirth A, Giwercman A, Tournaye H, Diemer T, Kopa Z, Dohle G, et al. Guidelines on Male Infertility. *Eur Assoc Urol* 2012; 62 (2): 324-332. DOI: 10.1016/j.eururo.2012.04.048
- Krausz C, Forti G, McElreavey K. The Y chromosome and male fertility and infertility. *Int J of Androl* 2003;26(2):70-75. DOI:10.1046/j.1365-2605.2003.00402.x
- Reijo R, Lee TY, Salo P, Alagappan R, Brown LG, Rosenberg M, et al. Diverse spermatogenic defects in humans caused by Y chromosome deletions encompassing a novel RNA-binding protein gene. *Nat Genet* 1995;10(4):383-93. DOI: 10.1038/ng0895-383
- Гоголевский П.А., Гоголевская И.К. Y-хромосома и мужское бесплодие (обзор литературы). *Проблемы репродукции* 1999; 5 (5): 26-34.
- Черных В.Б., Курило Л.Ф., Поляков А.В. Y-хромосома, AZF-микроделеции и идиопатическое бесплодие у мужчин. *Проблемы репродукции*. 2001, 5 (7): 47-58.
- Choi J, Song SH, Bak CW, Sung SR, Yoon TK, Lee DR, et al. Impaired spermatogenesis and gr/gr deletions related to Y chromosome haplogroups in Korean men. *PLoS One* 2013; 7(8): e43550. DOI:10.1371/journal.pone.0043550
- Ferlin A, Moro E, Rossi A, Foresta C, Rossato M, Garolla A, et al. Role of the AZFa candidate genes in male infertility. *J of Endocr Invest* 2000; 23(10): 646-651. DOI: 10.1007/bf03343788
- Беляева Н.А., Глинкина Ж.И., Калинина Е.А. Современные аспекты и проблемы мужского бесплодия, ассоциированного с мутацией AZF локуса хромосомы Y. *Акушерство и гинекология* 2012; 8(2): 21-27.
- Черных В.Б., Курило Л.Ф., Гоголевская И.К. Комплексное клинико-генетическое обследование пациентов с азооспермией или олигозооспермией неясной этиологии. *Проблемы репродукции* 2001, 3 (7): 58-63.
- Foresta C, Moro E, Ferlin A. Y chromosome microdeletions and alterations of spermatogenesis. *Endocr Rev* 2001; 22(2):226-239. DOI:10.1210/edrv.22.2.0425
- Krausz C, Quintana-Murci L, McElreavey K. Prognostic value of Y deletion analysis: what is the clinical prognostic value of Y chromosome microdeletion analysis. *Hum Reprod* 2000;5(7):1431-1434. DOI:10.1093/humrep/15.7.1431
- Simoni M, Bakker E, Eurlings M, Matthijs, Moro, Muller, et al. Laboratory guidelines for molecular diagnosis of Y-chromosomal microdeletion. *Int J Androl* 1999; 22(5):292-299. DOI:10.1046/j.1365-2605.1999.00193.x
- Зобкова Г.Ю., Баранова Е.Е., Донников А.Е., Мшалая Г.Ж., Залетова В.В., Кошкина Т.Е., Трофимов Д.Ю. Спектр делеции фактора азооспермии (AZF) у мужчин с нормальным и нарушенным сперматогенезом. *Проблемы репродукции* 2017; 23(4): 109-113.
- Волков А.Н., Цуркан Е.В. P-TsR-диагностика AZF-микроделеции при установлении генетических причин мужского бесплодия. *Медицина в Кузбассе* 2016; 3: 23-27.
- Здановский В.М., Гоголевский П.А., Гоголевская И.К. Тестирование микроделеций на Y-хромосоме у пациентов с различными нарушениями сперматогенеза. *Проблемы репродукции* 2000; 6(6): 56-59.
- Tiepolo L, Zuffardi O. Localization of factors controlling spermatogenesis in the non fluorescent portion of the human Y chromosome long arm. *Hum Genet* 1976; 34(2):119-124. DOI:10.1007/bf00278879
- Vollrath D, Foote S, Hilton A, Brown L, Beer-Romero P, Bogan J et al. The human Y chromosome: a 43-internal map based on naturally occurring deletions. *Science* 1992 Oct; 258 (5079): 52-59. DOI:10.1126/science.1439769
- Vogt PH, Edelmann A, Hirschmann P, Kohler MR. The azoospermia factor (AZF) of the human Y chromosome in Yq11: function and analysis in spermatogenesis. *Hum Mol Gene* 1996;5(7): 933-943. DOI:10.1071/rd9950685
- WHO (1999). Руководство ВОЗ по лабораторному исследованию эякулята человека и взаимодействия сперматозоидов с цервикальной слизью. Четвертое издание. *Cambridge University Press*, 1999. Пер. с англ. Р.А. Нерсисяна. Научн. ред. перевода проф. Л.Ф. Курило. М. 2001, 143 с.
- Wang RX, Fu C, Yang YP, Han RR, Dong Y, Dai RL, et al. Male infertility in China: laboratory finding for AZF microdeletions and chromosomal abnormalities in infertile men from Northeastern China. *J Assist Reprod Genet* 2010; 27(7): 391-396. DOI: 10.1007/s10815-010-9420-9

## REFERENCES (4, 5, 8, 9, 13-15, 19)

- Gogolevskiy P.A., Gogolevskaya I.K. Y-hromosoma i muzhskoe besplodie (obzor literaturyi). [Y-chromosome immunologic infertility (literature review)] *Problemi reprodukcii* 1999; 5(5): 26-34. (In Russian)
- Chernyih V.B., Kurilo L.F., Polyakov A.V. Y-hromosoma, AZF-mikrodeletsi i idiopatsicheskoe besplodie u muzhchin. [Y-chromosome, AZF-microdeletion and idiopathic infertility in men] *Problemi reprodukcii* 2001;5(7): 47-58. (In Russian)
- Belyaeva N.A., Glinkina Zh.I., Kalinina E.A. Sovremennyye aspektyi problemy muzhskogo besplodiya, assotsirovannogo s mutatsiy AZF lokusa hromosomy Y. [Modern aspects and problems of male infertility associated with the AZF mutation of the Y chromosome locus] *Akusherstvo i ginekologiya* 2012; 8(2): 21-27. (In Russian)
- Chernyih V.B., Kurilo L.F., Gogolevskaya I.K. Kompleksnoe kliniko-geneticheskoe obsledovanie patsientov s azoospermiey ili oligozoospermiey neyasnoy etiologii. [Complex clinical-genetic examination of patients with azoospermia or oligozoospermia of a non-obvious etiology] *Problemi reprodukcii* 2001;3(7): 58-63. (In Russian)
- Zobkova G.Yu., Baranova E.E., Donnikov A.E., Mshalaya G.Zh., Zaletova V.V., Koshkina T.E., Trofimov D.Yu. Spekr deletsiy faktora azoospermii (AZF) u muzhchin s normalnyim i narushennyim spermatogenezom. [The deletion spectrum of azoospermia factor (AZF) in men with normal and impaired spermatogenesis] *Problemi reprodukcii* 2017; 23(4): 109-113. (In Russian)
- Volkov A.N., Tsurkan E.V. P-TsR-diagnostika AZF-mikrodeletsiy pri ustanovlenii geneticheskikh prichin muzhskogo besplodiya. [P-TsR-diagnostics of AZF-microdeletion in the establishment of genetic causes of male infertility] *Meditsina v Kuzbasse* 2016; 3: 23-27. (In Russian)
- Zdanovskiy V.M., Gogolevskiy P.A., Gogolevskaya I.K. Testirovanie mikrodeletsiy na Y-hromosome u patsientov s razlichnyimi narusheniyami spermatogeneza/ [Testing of microdeletions on the Y chromosome of the patients with various disorders of spermatogenesis] *Problemi reprodukcii* 2000;6(6): 56-59. (In Russian)
- WHO (1999). Rukovodstvo VOZ po laboratornomu issledovaniyu eyakulyata cheloveka i vzaimodeystviya spermatozoidov s tservikalnoy slizyu. Chetvertoe izdanie. [WHO guidelines on laboratory research of human ejaculate and the interaction of spermatozoa with cervical mucus. Fourth Edition] Cambridge University Press, 1999. Per. s angl. R.A. Nersesyan. Nauchn. red. perevoda prof. L.F. Kurilo. M. 2001, 143 s. (In Russian)