

М.Я. ТИРКУС, Г.В. МАКУХ, Д.В. ЗАСТАВНА,
Н.Л. ГУЛЕЮК, А.Й. НАКОНЕЧНИЙ, Б.Р. СТОЙКА
Інститут спадкової патології АМН України, Львів
E-mail: ihp-zastavna@ukr.net

МІКРОДЕЛЕЦІЇ Y-ХРОМОСОМИ ЯК ПРОГНОСТИЧНИЙ МАРКЕР НЕПЛІДЬ У ЧОЛОВІКІВ



Представлено результати молекулярно-генетичного дослідження мікрodelецій Y-хромосоми у чоловіків із порушеннями сперматогенезу та у пацієнтів з крипторхізмом. Проведено дослідження регіонів AZFa, AZFb, AZFc з використанням ДНК-аналізу у STS-локусах – sY84, sY86, sY127, sY134, sY254, sY255 та гена SRY. Мікрodelеції Y-хромосоми виявлено у 13,3 % обстежених інфертильних чоловіків з порушеними показниками спермограм, що свідчить про значну інформативність даного дослідження. Частота генетичних (цито- та молекулярно-генетичних) порушень у хлопчиків з ізольованим крипторхізмом склала 4 %, що вимагає подальшого вивчення генетичних передумов крипторхізму. Налагодження та оптимізація молекулярно-генетичного дослідження мікрodelецій Y-хромосоми має велике значення для практичної медицини.

© М.Я. ТИРКУС, Г.В. МАКУХ, Д.В. ЗАСТАВНА,
Н.Л. ГУЛЕЮК, А.Й. НАКОНЕЧНИЙ, Б.Р. СТОЙКА, 2008

Вступ. Близько 15 % подружніх пар мають проблеми із репродукційним здоров'ям. Чоловічий фактор в структурі непліддя складає від 30 до 50 % [1].

Причиною генетично зумовлених порушень будови та функціонування чоловічої статеві сфери дуже часто є зміни в Y-хромосомі. Зокрема, на короткому плечі Y-хромосоми знаходиться ген SRY, який спричиняється до диференціації гонад ембріона в яєчка. Транслокація SRY-гена з Y- на X-хромосому (або аутосому) призводить до формування чоловічого фенотипу при жіночому XX-каріотипі (синдром де ля Шапеля). Навпаки, при 46XY-генотипі проявляється жіночий фенотип у випадку відсутності короткого плеча Y-хромосоми чи її дистальної ділянки. Порушення функціонування чоловічої статеві сфери часто пов'язують із змінами у довгому плечі Y-хромосоми, зокрема із «локусом азооспермії» – AZF-локусом, мікрodelеції в якому зустрічаються з частотою від 2 до 11 % чоловіків з порушеннями процесів сперматогенезу [2–5].

Мікрodelеції в Y-хромосомі описані також при крипторхізмі – неопущенні яєчок/яєчка [6]. І хоча до кінця незрозумілим залишається внесок генетичної компоненти у генез крипторхізму, небезпідставним вважаємо припущення, що крипторхізм – це тенденція організму до самостерилізації з метою запобігання відтворення неповноцінного потомства. І як підтвердження цього – дуже часте поєднання крипторхізму з цілим рядом вроджених вад розвитку при численних генетичних синдромах, кількість яких сягає 46.

Метою роботи було з'ясування частоти та спектра мікрodelецій Y-хромосоми у чоловіків з порушеннями сперматогенезу та у пацієнтів з крипторхізмом.

Матеріали і методи. Обстежувана група складалася із чоловіків з порушеними показниками спермограми (60 осіб) та хлопчиків, скерованих на оперативне втручання з приводу крипторхізму (48 осіб). Контрольна група практично здорових чоловіків з нормальними показниками спермограми складала 30 осіб.

У групі пацієнтів з порушеними показниками спермограми, а також у групі пацієнтів з крипторхізмом та контрольній групі проводили виділення та очистку ДНК із лейкоцитів периферійної крові методом ферментативного розщеплення та подальшої фенольної екс-

тракції [7]. На наступних етапах дослідження здійснювали ампліфікацію послідовностей ДНК *in vitro*, використовуючи метод полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР) [8]. ПЛР проводили в автоматичному режимі на термоциклері «Терцик» («ДНК-технологія», Росія), використовували олігонуклеотидні праймери та термостабільну Taq-полімеразу («Fermentas», Литва). Для аналізу використовували дві мультиплексні реакції для трьох AZF-регіонів та контрольного фрагменту SRY. Мультиплексну реакцію проводили при загальних об'ємах суміші 25 мкл.

Аналіз продуктів ПЛР здійснювали шляхом електрофорезу у 2%-ному агарозному гелі. Електрофорез проводили протягом 30–40 хв при напрузі 100 В та сканували електрофореграму на ультрафіолетовому транслюмінаторі. Отримані сигнали порівнювали з маркерами довжин і на основі цього детектували розміри отриманих фрагментів.

Результати досліджень та їх обговорення. Першим етапом роботи було налагодження методів молекулярно-генетичної детекції порушень в Y-хромосомі.

Як уже зазначено, на короткому плечі Y-хромосоми знаходиться ген SRY, що визначає диференціацію гонад ембріона в яєчка, а у еухроматиновій ділянці довгого плечі Y-хромосоми знаходиться AZF-локус. Мутації генів цих ділянок якраз і визначають порушення чи диференціації статі, чи процесів сперматогенезу у чоловіків. Відповідно, в результаті проведеної роботи налагоджено детекцію AZFa-, AZFb-, AZFc-регіонів AZF-локуса довгого плеча Y-хромосоми та SRY-гена короткого плеча Y-хромосоми.

У всіх пацієнтів із лейкоцитів периферійної крові виділено ДНК, яка поповнила банк ДНК Інституту спадкової патології АМН України. У досліджуваній групі переважали чоловіки із оліго- та астеноспермією, що зустрічалися у понад 30 % пацієнтів. Значний відсоток порушень сперматогенезу має присутність дегенеративних форм сперматозоїдів (тератоспермія) – 23,3 % та відсутність сперматозоїдів в еякуляті (азооспермія) – 16,7 %.

В результаті даної роботи налагоджено методику молекулярно-генетичного дослідження мікрodelеції ділянок AZFa, AZFb та AZFc із використанням ДНК-аналізу в STS-локусах –

sY84, sY86, sY127, sY134, sY254, sY255. Для цього дослідження використовували дві мультиплексні реакції для трьох вказаних регіонів та контрольного фрагменту SRY.

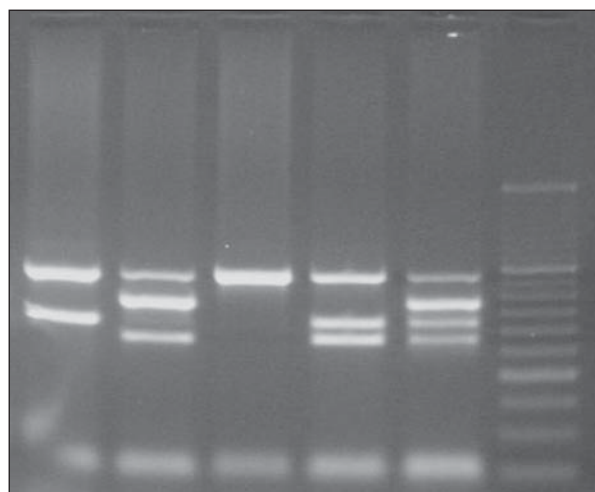
Мультиплексна реакція А дозволяє аналізувати локуси SRY (472 п.н.), sY254 (400 п.н.), sY86 (320 п.н.), sY127 (274 п.н.), мультиплексна реакція В – локуси SRY (472 п.н.), sY84 (326 п.н.), sY134 (301 п.н.), sY255 (126 п.н.). Дослідження кожної проби проводили не менш як у двох повторях. Відсутність на електрофореграмі певних фрагментів свідчила про наявність мікрodelецій у відповідних локусах. Електрофореграми молекулярно-генетичного дослідження мікрodelецій Y-хромосоми наведено на рис. 1 та 2.

Наступним етапом роботи було дослідження мікрodelецій Y-хромосоми AZF-регіону та гена SRY дослідної групи пацієнтів з порушеннями фертильності та процесів сперматогенезу.

Окремо слід зазначити, що всі обстежувані пацієнти каріотиповані. Серед них у двох чоловіків з непліддям та аспермією діагностовано синдром Кляйнфельтера (47, XXY), ще у двох пацієнтів з аспермією та гіпогонадізмом встановлено синдром де ля Шапеля (46, XX).

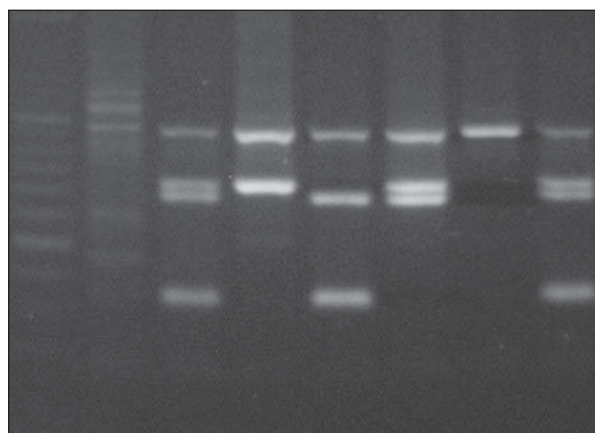
Молекулярно-генетичні дослідження AZF-регіону та SRY-гена Y-хромосоми у пацієнтів з порушеннями каріотипу дозволили встановити, що у чоловіків із каріотипом 47, XXY (синдром Кляйнфельтера) не виявлено жодних змін при дослідженні Y-хромосоми. У індивідів із каріотипом 46, XX встановлено відсутність усієї послідовності AZFa, AZFb та AZFc. Щодо гена SRY, то в одного пацієнта із синдромом де ля Шапеля він присутній, а у іншого – відсутній. Такі дані, очевидно, свідчать про різні механізми порушень у обстежуваних чоловіків із каріотипом 46, XX і передбачають подальші дослідження, принаймні, з метою встановлення місця локалізації гена SRY у одного з них.

В обстежених пацієнтів з порушеннями фертильності при нормальному каріотипі виявлено наступний спектр мутацій: мікрodelеції субрегіону AZFa виявлено у однієї особи, субрегіонів AZFb і AZFc (AZFb + c) – у однієї особи, мікрodelеції субрегіону AZFc виявлено у трьох осіб. Ще у одного чоловіка з азооспермією та нормальним каріотипом встановлено відсутність усієї послідовності AZFa, AZFb та



1 2 3 4 5 6

Рис. 1. Аналіз мікрodelецій Y-хромосоми, 2%-ний агарозний гель. Мультиплексна реакція А: 1 – мікрodelеція в локусах sY254 та sY127; 2 – мікрodelеція в локусі sY86; 3 – мікрodelеція в локусах sY254, sY86 та sY127; 4 – мікрodelеція в локусі sY254; 5 – відсутність мікрodelецій; 6 – маркери молекулярної маси (Ladder, 50 bp)



1 2 3 4 5 6 7 8

Рис. 2. Аналіз мікрodelецій Y-хромосоми, 2%-ний агарозний гель. Мультиплексна реакція В: 1 – маркери молекулярної маси (Ladder, 50 bp); 2 – продукт ПЛР ДНК жіночої статі; 3, 8 – відсутність мікрodelецій; 4 – мікрodelеція в локусах sY134 та sY255; 5 – мікрodelеція в локусі sY84; 6 – мікрodelеція в локусі sY255; 7 – мікрodelеція в локусах sY134 та sY255

AZFc AZF-локуса Y-хромосоми та SRY-гена. Тобто, у 6 (11,7 %) обстежених інфертильних чоловіків з нормальним каріотипом встановлено мікрodelеції генів Y-хромосоми. Відносно ж усієї групи обстежених інфертильних чолові-

ків, то відсоток мікрodelецій Y-хромосоми сягає 13 %. Зведені результати досліджень представлені у табл. 1.

Найчастіше ушкоджено субрегіон AZFc, відсутність якого встановлено у 7 із 8 виявлених випадків мутацій AZF-локуса, причому ізольовані делеції AZFc-субрегіону супроводжувалися складними комбінаціями порушень процесів сперматогенезу у вигляді оліготератозооспермії чи олігоастенотератозооспермії. Отримані результати збігаються з літературними даними [9, 10], згідно з якими порушення у цій AZF-ділянці є найрозповсюдженішими.

У даній роботі детекція гена SRY служила як для внутрішнього контролю реакції, так і для визначення наявності Y-хромосоми. Відсутність даної ділянки встановлено у одного із чоловіків з каріотипом 46, XX. Заслугує на увагу і вимагає подальшого дослідження другий випадок – чоловік з каріотипом 46, XX при наявності гена SRY.

З метою уникнення псевдонегативних результатів нами проведено дослідження даного зразка ДНК для генів, розташованих на аутосомах, що дало позитивний синтез. Поясненням відсутності синтезу усіх досліджуваних ділянок у даного індивіда може бути наявність порушень у ділянках Y-хромосоми, що комплексарні до використовуваних у дослідженні праймерів. Цей випадок вимагає подальших досліджень із використанням секвенування.

Спектр регіонів мутованих генів у чоловіків із каріотипом 46, XY представлений у табл. 2.

Найчастіше делетований AZFc-субрегіон Y-хромосоми, причому делеція захоплювала обидві вивчені ділянки AZFc-регіону – Y254 та Y255. Сумарна частота мутацій в цих ділянках складала 40 % від всіх знайдених мутацій. Наші дані принципово співзвучні з даними інших дослідників [9, 10] щодо спектра делецій AZF-регіону: найчастіше при азоо- та олігозооспермії зустрічаються делеції AZFc та AZFb+c.

Слід зазначити, що у обстежених нами фертильних чоловіків-волонтерів (30 осіб контрольної групи) мікрodelеції Y-хромосоми не були виявлені у жодному випадку.

Як правило, мікрodelеції Y-хромосоми виникають *de novo*, і причини їх виникнення невідомі [11]. З іншого боку, можливим механізмом стерилізації чоловіків є крипторхізм

(неопущення яєчок). Внесок генетичної компоненти у генез крипторхізму залишається нез'ясованим, і все виразнішим стає твердження, що крипторхізм — це тенденція організму до самостерилізації з метою запобігання відтворення неповноцінного потомства. І як підтвердження цього — дуже часте поєднання крипторхізму з іншими вродженими вадами при цілому ряді генетичних синдромів. Крипторхізм зустрічається при іхтіозі, пахідермато-періостозі, ювенільній формі м'язової дистрофії Дюшена, синдромах Нунана, Арського, Кальмана (гіпогонадотропний гіпогонадизм з аносмією), Клайнфельгера, Дайна, Морфана, Беквіта-Відемана, Сільвера-Рассела. Немає також однозначних даних, в якому відсотку і при яких умовах крипторхізм в подальшому зумовлює порушення статевого здоров'я та самовідтворення [6]. Разом з тим окремі дані, зокрема приведені японськими вченими Suzuki et al. [12] та Mutoh et al. [13] щодо наявності у пацієнтів з крипторхізмом термінальних делецій деяких аутосом (авторами приводяться дані мікрodelеції 10-ї хромосоми), передбачають подальше вивчення генетичних передумов крипторхізму.

Отже, припущення про можливість генетичної природи крипторхізму спонукало нас до проведення молекулярно-генетичних обстежень на предмет мікрodelеції Y-хромосоми хлопчиків, скерованих на оперативне втручання з приводу опущення яєчок/яєчка в калитку. Всього обстежено 48 хлопчиків віком від 6 до 14 років. Двосторонній крипторхізм діагностовано у 18 пацієнтів, односторонній — у 30 пацієнтів.

Цитогенетичні дослідження зафіксували каріотип 46, XY у всіх обстеженнях при каріотипі mos 46, XYinv (2)(p11q13)[20]/46, XY [20] у одного індивіда з лівостороннім крипторхізмом.

Молекулярно-генетичні дослідження у групі хлопчиків з крипторхізмом виявили у однієї особи мікрodelецію субрегіону AZFb у ділянці Y127. Клінічно цей хлопчик мав двобічний крипторхізм при нормальному каріотипі. В процентному відношенні це становило 2 % загальної кількості обстежених.

Отримані результати насторожують, якщо врахувати, що обстежені хлопчики не склали групу пацієнтів із генетичними синдромами, в

яких крипторхізм є складовою частиною комплексних порушень. Обстежені пацієнти характеризувалися ізольованим крипторхізмом, і при цьому частота генетичних (цито- та молекулярно-генетичних) порушень склала 4 %. Такі результати підтверджують результати інших дослідників щодо необхідності подальшого вивчення генетичних передумов крипторхізму.

Особливо слід наголосити, що переважна більшість описаних порушень утворюється *de novo*, але разом з тим закріплюється в подальших поколіннях. Це необхідно враховувати при рекомендаціях додаткових репродукційних технологій.

Таблиця 1
Спектр мутацій Y-хромосоми у інфертильних чоловіків в поєднанні з каріотипом

| Каріотип | Порушення сперматогенезу | Мікрodelеції Y-хромосоми |
|----------|---|--------------------------|
| 46,XX | Аспермія | AZFa + b + c; SRY |
| 46,XX | Дослідження сперми не проводилося, гіпогонадизм | AZFa + b + c |
| 46, XY | Азооспермія | AZFa |
| 46, XY | Азооспермія | AZF b+c |
| 46, XY | Азооспермія | AZFa + b + c; SRY |
| 46, XY | Олігоастенотератозооспермія | AZFc |
| 46, XY | Олігоастенотератозооспермія | AZFc |
| 46, XY | Оліготератозооспермія | AZFc |

Таблиця 2
Частоти мікрodelеції Y-хромосоми різних регіонів

| Регіони Y-хромосоми | Детекція делецій, n | Частота, % |
|---------------------|---------------------|------------|
| AZFa | | |
| sY84 | 4 | 13,33 |
| sY86 | 4 | 13,33 |
| AZFb | | |
| sY127 | 4 | 13,33 |
| sY134 | 4 | 13,33 |
| AZFc | | |
| sY254 | 6 | 20 |
| sY255 | 6 | 20 |
| SRY | 2 | 6,66 |
| Всього | 30 | 100 |

Висновки. Мікрodelеції Y-хромосоми виявлено у 13,3 % обстежених інфертильних чоловіків з порушеними показниками спермограм, що свідчить про значну інформативність даного дослідження. Частота генетичних (цито- та молекулярно-генетичних) порушень у хлопчиків з ізольованим крипторхізмом склала 4 %, що вимагає подальшого вивчення генетичних передумов крипторхізму. Проведення молекулярно-генетичних досліджень у чоловіків із порушеними параметрами спермограм дозволяє встановлювати етіологічно коректний діагноз, що значно скорочує терміни обстеження, а отже і лікування. Встановлення генетичного чинника виникнення непліддя дозволяє уникнути дороговартісної емпірично призначуваної терапії.

Роботу виконано за фінансової підтримки Західно-українського біомедичного дослідницького центру підтримки молодих вчених (WUBMRC).

SUMMARY. The results of molecular-genetic study of Y-chromosome microdeletions in men with spermatogenesis failure and in patients with cryptorchism are presented. The molecular-genetic studies of regions AZFa, AZFb, AZFc in STS loci – sY84, sY86, sY127, sY134, sY254, sY255 and SRY gene have been performed. Y-chromosome microdeletions were detected in 13,3 % infertile men with spermogram failure. The frequency of genetic (cyto- and molecular) abnormalities among boys with isolated cryptorchism was 4 %. The results show the necessity of additional study of genetic factors of cryptorchism development.

РЕЗЮМЕ. Представлены результаты молекулярно-генетического исследования микроделетций Y-хромосома у мужчин с нарушениями сперматогенеза и у пациентов с крипторхизмом. Проведено исследование регионов AZFa, AZFb, AZFc с использованием ДНК-анализа в STS-локусах – sY84, sY86, sY127, sY134, sY254, sY255 и гена SRY. Микроделетции Y-хромосома выявлены у 13,3 % обследованных инфертильных мужчин с нарушенными показателями спермограмм, что указывает на значительную информативность настоящего исследования. Частота генетических (цито- и молекулярно-генетических) нарушений у мальчиков с изолированным крипторхизмом составляла 4 %, что требует дальнейшего изучения генетических предпосылок крипторхизма.

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Долгов В.В., Луговская С.А., Фанченко Н.Д. и др. Лабораторная диагностика мужского бесплодия. – М., 2006. – 144 с.
2. Гоголевская И.К., Гоголевский П.А. Y-хромосома и мужское бесплодие // Пробл. репродукції. – 1999. – № 5. – С. 25–31.
3. Лівшиць Л.А., Пампуха В.М., Ясінська О.А. та ін. Створення та впровадження в медичну практику тест-систем для генної діагностики тяжких спадкових захворювань // Наука та інновації. – 2005. – 1, № 3. – С. 62–69.
4. Simoni M., Bakker E., Krausz C. EAA/EMQN best practice guidelines for molecular diagnosis of Y-chromosomal microdeletions // Int. J. Androl. – 2004. – № 27. – P. 240–249.
5. Tiepolo L., Zuffardi O. Localization of factors controlling spermatogenesis in the nonfluorescent portion of the human Y-chromosome long arm // Hum. Genet. – 1976. – 34. – P. 119–124.
6. Foresta C., Moro E., Garolla A. et al. Y chromosome microdeletions in cryptorchism and idiopathic infertility // J. Clin. Endocrin. and Metab. – 1999. – 84, № 10. – P. 3660–3665.
7. Маниатис Т., Фриз Е.Е., Сэмбрук Ж. Молекулярное клонирование. – М.: Мир, 1985. – 420 с.
8. McPherson M.J., Quirke P., Taylor G.R. PCR a Practical Approach. – New York : Univ., 1993. – 253 p.
9. Foresta C., Ferlin A., Garolla A. et al. High frequency of well-defined Y-chromosome deletions in idiopathic Sertoli cell-only syndrome // Hum. Reprod. – 1998. – 13. – P. 302–307.
10. Girardi S.K. Submicroscopic deletions in the Y chromosome of infertile men // Hum. Reprod. – 1997. – 12. – P. 1635–1641.
11. Edwards R.G., Bishop C.E. On the origin and frequency of Y chromosome deletions responsible for severe male infertility // Mol. Hum. Reprod. – 1997. – 3. – P. 549–554.
12. Suzuki Y., Sasagawa T., Nakada T. et al. Bilateral cryptorchidism associated with terminal deletion of 10q // Urol. Inter. – 1998. – 61, № 3. – P. 186–187.
13. Mutoh A., Sasagawa I., Tateno T. et al. Long arm deletion of chromosome 10 in boy with monorchidism // Scand. J. Urol. and Nephrol. – 1999. – 33, № 1. – P. 77–78.

Надійшла 28.02.07