

DOI 10.23946/2500-0764-2018-3-4-6-11

ЧАСТОТА И СПЕКТР AZF-МИКРОДЕЛЕЦИЙ У МУЖЧИН С БЕСПЛОДИЕМ

ВОЛКОВ А.Н.^{1,2}, ЦУРКАН Е.В.²¹ФГБОУ ВО «Кемеровский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации, г. Кемерово, Россия²ГАУЗ КО «Кемеровская областная клиническая больница имени С.В. Беляева», г. Кемерово, Россия

ORIGINAL RESEARCH

PREVALENCE AND TYPES OF AZF MICRODELETIONS IN INFERTILE MEN

ALEXEY N. VOLKOV^{1,2}, ELENA V. TSURKAN²¹Kemerovo State Medical University (22a, Voroshilova Street, Kemerovo, 650056), Russian Federation²Kemerovo Regional Clinical Hospital named after S.V. Belyaev (22, Oktyabrskiy Prospekt, Kemerovo, 650061), Russian Federation

Резюме

Цель. Изучение количественных и качественных характеристик AZF-микроделеций у мужчин, страдающих бесплодием.

Материалы и методы. Проведено генотипирование AZF-локуса Y-хромосомы у 76 мужчин с первичным бесплодием. Возраст обследованных варьировал в пределах 23 – 38 лет при среднем значении $34,2 \pm 2,35$ года. Из цельной крови пациентов термокоагуляционным методом выделяли ДНК. Полученные образцы ДНК использовали для проведения ПЦР-амплификации STS-маркеров, специфичных для субрегионов AZFa, AZFb и AZFc. Рассчитывали общую частоту AZF-микроделеций и соотношение отдельных типов мутаций.

Результаты. Частота AZF-микроделеций в изученной выборке составила 7,8%, что сопоставимо с результатами предшествующих исследований. Преобладали микроделеции суб-

региона AZFc, патологический эффект которых в ряде случаев корректируется при помощи вспомогательных репродуктивных технологий. Прочие микроделеции, ассоциированные с более тяжелым нарушением сперматогенеза, встречались реже.

Заключение. Рекомендуется проведение генотипирования AZF-локуса всем пациентам с нарушениями сперматогенеза для исключения иных генетических и негенетических причин infertility. Ценность молекулярно-генетической диагностики микроделеций заключается также в возможности определения целесообразности применения вспомогательных репродуктивных технологий и шансов на репродуктивный успех у пациентов с бесплодием.

Ключевые слова: мужское бесплодие, AZF-микроделеции, вспомогательные репродуктивные технологии.

English ►

Abstract

Aim. To investigate prevalence and types of azoospermia factor (AZF) microdeletions in infertile men.

Materials and Methods. We performed the genotyping of AZF locus within Y chromosome in 76 male inhabitants of Kemerovo Region (23-38 years of age, mean with standard error 34.2 ± 2.35) with primary infertility. DNA was extracted from the peripheral blood utilizing thermocoagulation method

with the following amplification of sequence tagged sites (STS) specific for AZFa, AZFb, and AZFc subregions. We calculated the prevalence of AZF microdeletions and proportions of their different types.

Results. The prevalence of AZF microdeletions among infertile men in Kemerovo Region was 7.8%, comparable to other populations. Microdeletions in AZFc subregion, frequently correctable by assisted reproductive technology, were the predominant type.

Conclusions. We recommend genotyping of the AZF locus to all male patients with primary infertility to exclude other causes of this disorder. This approach may also define whether assisted reproductive technology

should be applied for infertility treatment in these patients, as in the case with microdeletions in AZFc subregion.

Keywords: male infertility, AZF microdeletions, assisted reproductive technology.

Введение

Мужское бесплодие является актуальной медико-социальной проблемой. По некоторым данным, до 5% супружеских пар являются бездетными, несмотря на активные попытки достичь беременности. Если при этом учесть, что на долю мужского фактора приходится до половины всех случаев бесплодия у супругов, становится очевидным, что 2-3% мужчин репродуктивного возраста будут вынуждены рано или поздно прибегнуть к специализированной медицинской помощи по диагностике и разрешению репродуктивной проблемы [1].

Анализ причин первичного мужского бесплодия позволяет выявить многочисленные экзо- и эндогенные факторы, приводящие к репродуктивной дисфункции. К числу последних относятся генетические нарушения: численные хромосомные аномалии, структурные изменения хромосом (хромосомные aberrации), генные мутации [1-3]. Современные молекулярно-генетические методы часто являются единственным инструментом для диагностики мутаций, приводящих к мужскому бесплодию, в связи с отсутствием у носителя иных фенотипических нарушений [4, 5].

AZF-микроделеции затрагивают локус Y-хромосомы, содержащий гены, активные при сперматогенезе. Характерным проявлением генетических нарушений данного типа является уменьшение количества сперматозоидов в эякуляте вплоть до их полного отсутствия, что и определило наименование данной хромосомной области (*Azoospermia Factor*). Современные вспомогательные репродуктивные технологии (ВРТ) в некоторых случаях позволяют преодолеть проблему бесплодия у мужчин с AZF-микроделециями путем экстракции сперматозоидов непосредственно из тестикулярной ткани для последующей процедуры экстракорпорального оплодотворения [1, 2, 4].

Определение частоты указанных аномалий является важной практической задачей медицинской генетики, так как позволяет спрогнозировать объем предполагаемой медицинской

помощи мужчинам с AZF-микроделециями и оценить репродуктивный потенциал конкретной популяции вообще. К настоящему времени во всем мире проведено достаточно много исследований распространенности данных мутаций в различных клинических группах мужчин на различных географических территориях [6-9]. Вместе с тем, имеются лишь единичные публикации о частоте AZF-микроделений среди жителей России [10], что не позволяет точно определить долю населения с генетически обусловленными нарушениями репродукции.

Цель исследования

Изучение количественных и качественных характеристик AZF-микроделений у мужчин, страдающих бесплодием.

Материалы и методы

Исследованием охвачены 76 мужчин с первичным бесплодием, постоянно проживающих на территории Кемеровской области. Возраст обследованных варьировал в пределах 23 – 38 лет при среднем значении показателя $34,2 \pm 2,35$ года. Все пациенты ранее проходили спермиологическое обследование, по результатам которого у них были выявлены различные аномалии сперматогенеза (олигозооспермия, азооспермия и др.). Для дальнейшего анализа причин репродуктивных нарушений все мужчины были направлены врачом-андрологом в медико-генетическую консультацию ГАУЗ «Кемеровская областная клиническая больница» с целью молекулярно-генетической диагностики AZF-микроделений.

Материалом для исследования послужили образцы венозной крови, собранные в вакуумные пробирки с ЭДТА в качестве антикоагулянта. Выделение ДНК осуществляли термокоагуляционным способом с помощью реагента «ДНК-экспресс-кровь» (ООО НПФ «Литех»). Генотипирование AZF-локуса Y-хромосомы проводили с использованием тест-системы «AZF-микроделеции» (ООО НПФ «Литех») путем амплификации STS-маркеров, ассоциированных с сублокусами AZFa, AZFb и AZFc,

с детекцией результата мультиплексной ПЦР в режиме реального времени на приборе CFX96 («Bio-Rad Laboratories, Inc»).

Статистический анализ первичных данных включал расчет общих характеристик выборки обследованных: среднее арифметическое значение возраста, стандартная ошибка среднего значения, возрастной диапазон. Частотные показатели AZF-микроделеций вычислялись как

частное от деления количества наблюдаемых случаев на общее число обследованных. Также рассчитывалась доля каждого типа микроделеций от их общего количества.

Результаты и обсуждение

Среди обследованных нами мужчин с бесплодием носителями AZF-микроделеций оказались 6 человек (7,9%) (таблица 1).

Таблица 1.

Суммарная частота AZF-микроделеций у мужчин с бесплодием по данным различных исследований

Обследовано мужчин с бесплодием <i>Males with primary infertility</i>	Частота AZF-микроделеций <i>Prevalence of AZF microdeletions</i>		Источник информации <i>Source</i>
	<i>n</i>	%	
76	6	7,9	Собственные данные <i>Own results</i>
514	43	8,4	[10]
450	34	7,6	[6]
1226*	134	10,93	[9]
1050*	136	12,95	[8]

Примечания: *n* – количество обследованных лиц с указанным признаком;

*- только мужчины с азооспермией и олигозооспермией.

*exclusively patients with azoospermia and oligozoospermia

Table 1.

Prevalence of AZF microdeletions in infertile men according to the literature

Это свидетельствует о том, что большинство пациентов имеют иные отклонения, приводящие к репродуктивной дисфункции, и нуждаются в дополнительных клинических исследованиях как генетических, так и негенетических составляющих здоровья. Напротив, для мужчин с микроделециями Y-хромосомы проведение дальнейших обследований будет излишним. Согласно мировому опыту, шансы на естественное зачатие у таких пациентов крайне невелики. Систематизируя результаты исследований предшественников, С.У.Форе́ста и соавт. (2001) пришли к заключению, что только 1,6% мужчин с AZF-микроделециями характеризуются нормоспермией, в то время как 14,1 % имеют олигозооспермию, т.е. сниженное количество сперматозоидов (менее 5 млн/мл) либо наблюдается азооспермия, т.е. полное отсутствие сперматозоидов в эякуляте (84,3% пациентов) [6].

Еще менее оптимистичную картину рисуют С. Крауз и С. Дегл'Инно́сенти (2006). Двойное «слепое» исследование по генотипированию Y-хромосом 1000 мужчин с нормоспермией показало отсутствие среди них носителей микроделеций AZF-региона. Учитывая это, ранее опубликованные случаи сохранения нормального сперматогенеза при AZF-микроделециях, возможно, являются методическим артефактом [11].

Очевидно, AZF-микроделеции являются надежным диагностическим показателем, позво-

ляющим четко очертить группу мужчин с низкими репродуктивными возможностями. Единственным способом преодоления мужского бесплодия в этом случае является использование ВРТ, в частности, получение сперматозоидов непосредственно из тканей яичка или его придатка для последующего оплодотворения *in vitro*. Имеются данные о ряде случаев рождения здоровых детей у мужчин, воспользовавшихся этим алгоритмом [7, 12]. При этом следует помнить, что все родившиеся таким образом мальчики наследуют от отцов поврежденную Y-хромосому и также будут иметь сниженную фертильность.

Установленная нами суммарная частота делеций AZF-региона была сопоставлена с ранее полученными значениями, характерными для других выборок. На основании результатов генотипирования 514 мужчин Центральной России с бесплодием В.Б. Черных и соавт. установили частоту AZF-микроделеций на уровне 8,4% [10]. Сходная распространенность этих мутаций (7,6%) обнаружена и среди инфертильных мужчин Западной Европы [6].

Рассматриваемый показатель в значительной степени зависит от характера нарушения сперматогенеза у бесплодных мужчин, и, как следствие, от критериев включения мужчин в данную клиническую группу при планировании и выполнении исследований. Так, среди мужчин с тяжелой олигозооспермией и азооспермией

	Собственные данные <i>Own data</i>		[10]		[8]		[9]		[6]	
	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%
AZF-микроделеции, включая: <i>AZF microdeletions including</i>	6	100	43	100	136	100	134	100	265*	100
AZFa	1	16,7	2	4,7	3	2,2	10	7,5	13	4,9
AZFb	-	-	-	-	18	13,3	11	8,2	42	15,8
AZFc	3	50,0	33	76,7	102	75,0	73	54,5	158	59,6
AZFa + b	-	-	-	-	-	-	-	-	4	1,5
AZFb + c	2	33,3	8	18,6	13	9,6	28	20,9	22	8,3
AZFa + b + c	-	-	-	-	-	-	7	5,2	10	3,8
Делеции вне AZF-локуса <i>Deletions beyond AZF locus</i>	н.о. N/D	н.о. N/D	н.о. N/D	н.о. N/D	н.о. N/D	н.о. N/D	5	3,7	16	6,0

Таблица 2.

Соотношение отдельных типов микроделеций Y-хромосомы у мужчин с бесплодием по данным различных исследований

Table 2.

Types of AZF microdeletions in infertile men according to the literature

Примечания: n – количество микроделеций указанного типа; * - приведены обобщенные данные разных исследований, опубликованные в 1992-2000 гг.; н.о. – не определялись

*pooled data from different studies published in 1992-2000, N/D – not defined

частота носителей AZF-микроделеций превышает 10% [8, 9].

В практическом плане важным является тип AZF-микроделеций, выявленный у конкретного пациента. Мужчины с повреждением субрегиона AZFc (и реже – субрегиона AZFb) могут иметь в эякуляте и/или в биоптатах яичка сперматозоиды. Поэтому выявление мутации данного региона может быть показанием для применения процедур ВРТ, что дает надежду на появление у пациента потомства. Напротив, наличие микроделеции AZFa является плохим прогностическим признаком и делает нецелесообразными дальнейшие манипуляции по получению сперматозоидов у обследуемого ввиду их полного отсутствия в большинстве клинических случаев [7].

В исследуемой нами выборке среди мужчин с AZF-микроделециями существенно преобладали носители мутации субрегиона AZFc (50%) (таблица 2). Несколько реже обнаруживалась микроделеция одновременно двух субрегионов: AZFc и AZFb (33,3%). Наиболее редко встречается потеря субрегиона AZFa (16,7%). Учитывая небольшой объем группы обследованных, полученные нами данные можно считать предварительными, требующими сравнения с результатами ранее проведенных исследований.

Изучение спектра AZF-микроделеций у мужчин Центральной России позволило выявить тенденции, сходные с установленными нами. И хотя численные значения частот отдельных мутаций существенно отличались от приведенных

выше, также значительно преобладали мутации, затрагивающие субрегионы AZFc и AZFb. Менее 5% мужчин с AZF-микроделециями имели поврежденный субрегион AZFa [10].

По мере увеличения объема выборки повышается вероятность обнаружения дополнительных типов мутаций локуса AZF. Так, ряду исследователей удалось обнаружить изолированную микроделецию AZFb [6, 8, 9], редкие сочетания нескольких микроделеций, таких как AZFa+b [6], и делецию всего AZF-региона [6, 9]. Следует отметить, что доля упомянутых необычных микроделеций невысока. Как и в нашей работе, во всех цитируемых исследованиях более 50% мутаций AZF-локуса локализовались в субрегионе AZFc, а выявленные нами типы микроделеций во всех сравниваемых группах суммарно составляли более 70% от общего количества AZF-микроделеций.

Заключение

В исследованной выборке инфертильных мужчин, проживающих в Кемеровской области, 7,9% обследованных оказались носителями различных микроделеций в AZF-локусе Y-хромосомы, что является достаточной причиной нарушения репродукции. Анализ собственных данных и результатов аналогичных исследований показал, что наиболее часто мутация затрагивает субрегион AZFc. В этом случае сохраняется возможность компенсации сниженной фертильности путем применения ВРТ. Более редкими являются микроделеции в субре-

гионах AZFa и AZFb, они приводят к практически полному нарушению сперматогенеза и делают нецелесообразным применение ВРТ.

Учитывая довольно высокую частоту AZF-микроделеций среди мужчин с бесплодием, можно рекомендовать проведение генотипирования AZF-локуса всем пациентам с нарушениями сперматогенеза для исключения иных

генетических и негенетических причин infertility. Ценность молекулярно-генетической диагностики микроделеций заключается также в возможности определения целесообразности и шансов на репродуктивный успех при использовании пациентами с AZF-микроделециями ВРТ для решения проблемы мужского бесплодия.

Литература / References:

- Jungwirth A, Giwercman A, Tournaye H, Diemer T, Kopa Z, Dohle G, et al. European Association of Urology guidelines on male infertility: The 2012 Update. *Eur Urol.* 2012; 62 (2): 324-332. doi: 10.1016/j.eururo.2012.04.048.
- Foresta C, Ferlin A, Gianaroli L, Dallapiccola B. Guidelines for the appropriate use of genetic tests in infertile couples. *Eur J Hum Genet.* 2002; 10 (5): 303-312. doi: 10.1038/sj.ejhg.5200805.
- Volkov AN, Rytenkova OI, Lysenko DI, Lugovoy KA. Cytogenetics of reproductive disorders in men. *Medicine in Kuzbass.* 2017; 16 (1): 18-23. Russian (Волков А.Н., Рытенкова О.И., Лысенко Д.И., Луговой К.А. Цитогенетика репродуктивных нарушений у мужчин // Медицина в Кузбассе. 2017. Т. 16, № 1. С. 18-23).
- Krausz C, Hoefsloot L, Simoni M, Tüttelmann F; European Academy of Andrology; European Molecular Genetics Quality Network. EAA/EMQN best practice guidelines for molecular diagnosis of Y-chromosomal microdeletions: state-of-the-art 2013. *Andrology.* 2014; 2 (1): 5-19. doi: 10.1111/j.2047-2927.2013.00173.x.
- Volkov A, Tsurkan E. PCR diagnostics of AZF microdeletions in DIScovering of geneTic causes of male infertility. *Medicine in Kuzbass.* 2016; 15 (3): 23-27. Russian (Волков А.Н., Цуркан Е.В. ПЦР-диагностика AZF-микроделеций при установлении генетических причин мужского бесплодия // Медицина в Кузбассе. 2016. Т. 15, №3. С. 23-27).
- Foresta CY, 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.
- Gonçalves C, Cunha M, Rocha E, Fernandes S, Silva J, Ferraz L, et al. Y chromosome microdeletions in nonobstructive azoospermia and severe oligozoospermia. *Asian J Androl.* 2017; 19 (3): 338-345. doi: 10.4103/1008-682X.172827.
- Elfateh F, Rulin D, Xin Y, Linlin L, Haibo Z, Liu R. Prevalence and patterns of Y chromosome microdeletion in infertile men with azoospermia and oligozoospermia in Northeast China. *Iran J Reprod Med.* 2014; 12 (6): 383-388.
- Kim SY, Kim HJ, Lee BY, Park SY, Lee HS, Seo JT. Y chromosome microdeletions in infertile men with non-obstructive azoospermia and severe oligozoospermia. *J Reprod Infertil.* 2017; 18 (3): 307-315.
- Chernykh VB, Kurilo LF, Shileiko LV, Shirshova LS, Chukhrova AL, Kovalevskaya TS, et al. Microdeletion analysis of AZF locus in infertile males: cooperative research experience. *Medical Genetics.* 2003; 2 (8): 367-379. Russian (Черных В.Б., Курило Л.Ф., Шилейко Л.В., Шишова Л.С., Чухрова А.Л., Ковалевская Т.С. и др. Анализ микроделеций в локусе AZF у мужчин с бесплодием: совместный опыт исследований // Медицинская генетика. 2003. Т. 2, № 8. С. 367-379).
- Krausz C, Degl'Innocenti S. Y chromosome and male infertility: Update, 2006. *Front Biosci.* 2006; 11: 3049-3061.
- Krausz C, Forti G, McElreavey K. The Y chromosome and male fertility and infertility. *Int J Androl.* 2003; 26 (2): 70-75.

Сведения об авторах

Волков Алексей Николаевич, кандидат биологических наук, доцент кафедры биологии с основами генетики и паразитологии; старший научный сотрудник Центральной научно-исследовательской лаборатории ФГБОУ ВО «Кемеровский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации, г. Кемерово, Россия.

Вклад в статью: разработка дизайна исследования, генотипирование AZF-микроделеций, анализ результатов, написание статьи.

ORCID: 0000-0003-1169-715X

Цуркан Елена Владимировна, биолог медико-генетической консультации ГАУЗ КО «Кемеровская областная клиническая больница имени С.В. Беляева», г. Кемерово, Россия.

Вклад в статью: генотипирование AZF-микроделеций.

ORCID: 0000-0002-6268-6242

Authors

Dr. Alexey N. Volkov, PhD, Associate Professor, Department of Biology, Genetics and Parasitology; Senior Researcher, Central Research Laboratory, Kemerovo State Medical University, Kemerovo, Russian Federation.

Contribution: conceived and designed the study; performed the genotyping; wrote the manuscript.

ORCID: 0000-0003-1169-715X

Elena V. Tsurkan, MD, Biologist, Unit for Genetic Counseling, Kemerovo Regional Clinical Hospital named after S.V. Belyaev, Kemerovo, Russian Federation.

Contribution: performed the genotyping.

ORCID: 0000-0002-6268-6242

Корреспонденцию адресовать:

Волков Алексей Николаевич,
650056, г. Кемерово, ул. Ворошилова, д. 22а
E-mail: volkov_alex@rambler.ru

Corresponding author:

Dr. Alexey N. Volkov,
22a, Voroshilova Street, Kemerovo, 650056,
Russian Federation
E-mail: volkov_alex@rambler.ru

Для цитирования:

Волков А.Н., Цуркан Е.В. Частота и спектр AZF-микроделений у мужчин с бесплодием. *Фундаментальная и клиническая медицина*. 2018. Т. 3, № 4. С. 6–11.

For citation:

Alexey N Volkov, Elena V Tsurkan. Prevalence and types of AZF microdeletions in infertile men. *Fundamental and Clinical Medicine*. 2018; 3 (4): 6–11.

Статья поступила: 28.10.2018

Принята к печати: 30.11.2018