

ГЕНЕТИЧНІ ЧИННИКИ ЧОЛОВІЧОГО НЕПЛІДДЯ

Г.В. Макух¹, М.Я. Туркус¹, Д.В. Заставна¹, Н.Л. Гулеюк¹,
М.І. Мікула¹, Г.М. Безкоровайна¹, С.В. Гаврилишин², В.І. Черепанин³,
Д.З. Воробець⁴, Н.В. Гельнер¹

¹ ДУ "Інститут спадкової патології АМН України", м. Львів (директор - проф. О.З. Гнатейко)

² ДЗ "Прикарпатський центр репродукції людини МОЗ України", м. Івано-Франківськ (директор - Я.В. Босацький)

³ Львівський обласний центр репродуктивного здоров'я населення (директор - Ю.Ф. Іваночко)

⁴ Львівський національний медичний університет ім. Данила Галицького

Кафедра урології ФПДО (зав. - Ю.Б. Борис)

Реферат

Для з'ясування ролі генетичних чинників при чоловічому неплідді проведено комплексне дослідження частоти та спектру кількісних та структурних порушень хромосом, мікрodelецій AZF регіону, гену SRY та часткових делецій AZFc регіону Y хромосоми, а також мутацій та алейних варіантів гену TPBM у чоловіків з ідіопатичними порушеннями сперматогенезу жителів Західного регіону України. Встановлено високу результативність комплексу цито- та молекулярно-генетичних досліджень серед чоловіків з ідіопатичним непліддям. Внесок хромосомних аномалій при ідіопатичних порушеннях сперматогенезу склав 8,25%; мікрodelецій AZF регіону Y хромосоми - 7,25%; у 12,04% верифіковано чоловіче непліддя, зумовлене мутаціями гену TPBM - генітальну форму муковісцидозу. Часткові делеції AZFc регіону Y хромосоми виявлено у 8% неплідних чоловіків. Запропоновано алгоритм поетапних цито- та молекулярно-генетичних досліджень для чоловіків з ідіопатичним непліддям. Запровадження даного алгоритму у практику дозволяє поставити коректний діагноз, виключити зайві обстеження, уникнути непотрібного дорожовартісного лікування, своєчасно виявляти сім'ї високого ризику щодо репродуктивних втрат та підібрати коректні підходи під час застосування допоміжних репродуктивних технологій.

Ключові слова: чоловіче непліддя, сперматогенез, Y хромосома, AZF регіон, ген TPBM, мутація

CFTR gene mutations, and Y chromosome AZFc partial deletions were studied in western Ukrainian men with idiopathic disorders of spermatogenesis. Genetic causes of infertility were diagnosed in 17.5% of infertile males with varying defects of spermatogenesis. Quantitative and structural chromosome abnormalities were found in 8.25% of infertile men, including: Klinefelter's syndrome in 66.67%; AZF microdeletions in 7.25%; AZFa in 3.45%; AZFb in 10.34%; AZFb+c in 24.14%; and AZFc in 44.83%. Overall, 8.0% of azoospermic/oligospermic men without AZF microdeletions were found to have AZFc partial deletions: AZFc gr/gr deletion in 2.5% of infertile men (mainly with oligospermia); b2/b3 deletions in 4.5% (three with aspermia and six with oligoasthenoteratospermia); and absence of SY1291 locus in 1.0%. CFTR gene mutations and the 5T allele of polymorphic locus IVS8polyT were diagnosed to be the cause of infertility in 12.04% of males with suspected CFTR-related disorders. An algorithm for cyto- and molecular-genetic testing for males with idiopathic infertility (<5 million sperm/mL ejaculate) is suggested. Implementation of this algorithm in practice leads to the correct diagnosis, excluding extra tests to avoid unnecessary, expensive treatment, and it allows the timely detection of high-risk families for reproductive loss and helps in choosing the correct approach to the use of reproductive technologies.

Key words: male infertility, spermatogenesis, Y chromosome, AZF region, CFTR gene, mutation

Abstract

GENETIC FACTORS RELATED TO MALE INFERTILITY

H.V. MAKUKH¹, M.Y. TYRKUS¹, D.V. ZASTAVNA¹,
N.L. HULEYUK¹, M.I. MIKULA¹,
H.M. BEZKOROVAINA¹, S.V. GAVRYLYSHYN²,
V.I. CHEREPANYN³, D.Z. VOROBETS⁴, N.V. HELNER¹

¹ Institute of Hereditary Pathology of the Academy of Medical Sciences of Ukraine in Lviv

² Precarpathian Center of Human Reproductions in Ivano-Frankivsk

³ Regional Center for Population Reproductive Health in Lviv

⁴ The Danylo Halytsky National Medical University in Lviv

To clarify the role of genetic factors in the aetiology of idiopathic male infertility, quantitative and structural chromosome abnormalities, Y-chromosome microdeletions,

Вступ

Близько 15% подружніх пар є неплідними. У 40% випадків непліддя обумовлене чоловічим фактором. Приблизно у п'яти відсотків чоловіків репродуктивного віку спостерігаються різноманітні відхилення кількісних або якісних показників сперми, які призводять до непліддя. Близько третини таких випадків відносять до ідіопатичного непліддя [12]. Згідно з сучасними даними, ідіопатичне непліддя у чоловіків значною мірою зумовлене генетичними чинниками, серед яких виділяють кількісні та структурні порушення хромосом, мікрodelеції AZF регіону Y хромосоми, мутації гену трансмембранного регуляторного білка муковісцидозу та часткові де-

леції AZFc регіону Y хромосоми [3,9,11,14].

Метою роботи було з'ясувати частоту та спектр генетичних чинників формування порушень процесів сперматогенезу при ідіопатичному неплідді у чоловіків Західного регіону України та запропонувати алгоритм генетичних обстежень чоловіків з ідіопатичним непліддям.

Матеріал і методи

Обстежено 600 чоловіків, які звернулися у Львівський міжобласний медично-генетичний центр з діагнозом чоловіче непліддя та порушенням процесів сперматогенезу нез'ясованого генезу. Порушення процесів сперматогенезу в обстежуваній групі чоловіків характеризувалися як: аспермія, азооспермія, олігоспермія, олігозооспермія, олігоастенотератозооспермія. Вибірково спостерігалось зменшення об'єму еякуляту, збільшення в'язкості еякуляту, зниження рН еякуляту, поява дегенеративних форм, порушення рухливості, наявність аглютинації, відсутність клітин сперматогенезу. У деяких пацієнтів паралельно були діагностовано гіпогонадізм, непрохідність сім'явивідних протоків, прооперований в дитинстві крипторхізм, гіпоплазія яєчок. Контроль складався із 100 плідних чоловіків, які мають не менше 2-х здорових дітей і не мають скарг на репродуктивну функцію.

Виділення та очищення ДНК проводили методом висолювання [4]. Ампліфікацію послідовностей ДНК *in vitro* проводили, використовуючи метод полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР) [7,15]. Для ідентифікації мутацій застосовували метод делеційного, гетеродуплексного та рестрикційного аналізу продуктів ПЛР. Електрофорез продуктів ПЛР проводили в 2% агарозному гелі та у 10% поліакриламідному гелі.

Культивування лімфоцитів проводили за стандартною методикою з власними модифікаціями. Препарати забарвлювали GTG- або CBG-методами [2]. Стандартно аналізували на мікроскопі "Axiostar Plus" по 20-25 метафаз задовільної якості із кількістю 550 бендів на гаплоїдний набір. Статистичний аналіз даних проводили за загальноприйнятими методами [1]. Перевірку статистичних гіпотез проводили на рівні значущості $p \leq 0,05$.

Результати й обговорення

Аналіз результатів цитогенетичних досліджень у неплідних чоловіків показав, що внесок хромосомних аномалій при ідіопатичному неплідді складає 8,25%. У спектрі хромосомних аномалій, виявлених серед чоловіків із ідіопатичним порушенням сперматогенезу, суттєво переважала дисомія по X хромосомі (синдром Кляйнфельтера) із частотою 66,67%. На структурні аномалії хромосом (рівною мірою як статевих, так і аутосом) назагал припадало 12,12%, дисомія по Y хромосомі склала 6,06%. У п'яти випадках у неплідних чоловіків встановлений жіночий 46,XX каріотип при чоловічому фенотипі (синдром де ля Шапеля).

Із найвищою частотою аномалії каріотипу виявлялися серед осіб з аспермією/азооспермією - 18,00%, рідше у групі чоловіків з олігозооспермією/олігоастенотератозооспермією IV ст. - 6,00% та жодного випадку аномалій каріотипу не виявлено у групі осіб з кількістю сперматозоїдів в еякуляті >5 млн/мл (табл.1). Отже, порушення каріотипу зазвичай асоціювалися з важкими порушеннями процесів сперматогенезу.

Проведено молекулярно-генетичні дослідження мікроделецій AZFa, AZFb та AZFc ре-

Таблиця 1

Частота та спектр виявлених аномалій каріотипу та AZF мікроделецій в чоловіків з порушеннями процесів сперматогенезу

Кількість сперматозоїдів в еякуляті	Тип AZF мікроделецій	Частота, %	Аномалії каріотипу	Частота, %
Відсутні	AZFa; AZFb; AZFc; AZF(b+c) AZF(a+b+c)	13,33	47,XXY; 47,XYY 46,XX; 46,XYqh-[23]/45,X[10] 45,XY,der(13;14)(q10;q10)	18,00
<5 млн/мл	AZFc	8,00	47,XXY 46,X,delYq12 45,XY,der(13;14)(p11;p11)	6,00
>5 млн/мл	AZFc	0,67		0

гіонів та гена SRY Y хромосоми у групах неплідних та фертильних чоловіків. Мікрodelеції AZF регіону різного спектра виявлено у 7,25% неплідних чоловіків за їх повної відсутності в контрольній групі фертильних чоловіків ($p=0,016$). Найчастіше мікрodelеції виявляли у осіб з аспермією/азооспермією - 13,33% ($p=0,0001$). З нижчою частотою мікрodelеції виявляли в осіб з олігозооспермією/олігоастенотератозооспермією IV ст. - 8,00% ($p=0,004$) і лише в одного пацієнта з групи осіб, де кількість сперматозоїдів в еякуляті >5 млн/мл, виявлено мікрodelеції AZFc регіону Y хромосоми, що становить 0,67% ($p=0,6$) (табл.2). Мікрodelеції AZFa регіону виявлено в 3,45% випадків, мікрodelеції AZFb - у 10,34% випадків, мікрodelеції AZF(b+c) регіонів - у 24,14% випадків. Ці мікрodelеції асоціювалися з аспермією або азооспермією. У 44,83% детектовано мікрodelеції AZFc регіону при широкому спектрі порушень процесів сперматогенезу. У п'яти осіб встановлено відсутність усієї послідовності AZF(a+b+c) Y хромосоми.

Переважає більшість описаних вище AZF мікрodelецій утворюється *de novo*, але разом з тим, вони мають тенденцію до закріплення у подальших поколіннях по чоловічій лінії. Тому видається за необхідне проведення детекції мікрodelецій Y хромосоми у всіх чоловіків з кількістю сперматозоїдів в еякуляті <5 млн/мл та у чоловіків, які планують ІКСІ.

Із метою виявлення фенотипів, пов'язаних з мутаціями гена ТРБМ (CFTR-related disorders) проведено молекулярно-генетичні дослідження мутацій гена ТРБМ серед чоловіків із клінічними ознаками, характерними для цієї нозології: аспермія, азооспермія, дво- або одностороннє порушення прохідності сім'явивідних протоків або їх відсутність, знижений об'єм на-

сінної плазми, патологічна в'язкість еякуляту, знижене рН, підвищений рівень електролітів хлору в поті.

Ми сформували панель 29 мутацій гена ТРБМ для генетичного тестування чоловіків із підозрою на генітальну форму муковісцидозу: F508del, I507del, CFTRdele2,3(21kb), 2184insA, 2143delT, G542X, N1303K, W1282X, G551D, R553X, 1717-1G>A, 3849+10kbC>T, 621+1G>T, 1898-1G>A, R117H, D1152H, R347P, R347H, R347L, R347C, R334W, I336K, R560T, G551S, Q552X, Y122X, D1270N, S549I, S549N та 5T/7T/9T алелів поліморфного локусу IVS8polyT [6,8]. Мутацію F508del в гетерозиготному стані виявлено у 12,96% чоловіків з клінічними ознаками генітальної форми МВ, G542X - 0,93%, N1303K - 0,93%. У 20,37% виявлено 5T алель поліморфного локусу IVS8polyT.

Комбінація 5T алеля в одній копії гена з ТРБМ мутацією в іншій копії є найпоширенішою причиною генітальної форми МВ [10]. У результаті сукупного молекулярно-генетичного та клінічного аналізу у 13 із 108 осіб верифіковано чоловіче непліддя, зумовлене мутаціями гена ТРБМ - генітальну форму МВ, що назагал становить 12,04% (табл.2).

Метод ІКСІ може забезпечити можливість мати дітей чоловікам з генітальною формою МВ, але при цьому підвищується ризик народження дітей хворих на класичний МВ. Тому всім пацієнтам, залученим в програму лікування безпліддя методом ЕКО/ІКСІ необхідно проводити генетичний скринінг мутацій гена ТРБМ.

У 8,00% неплідних чоловіків виявили наявність різного спектру часткових делецій AZFc регіону Y хромосоми при їх відсутності у групі фертильних чоловіків ($p=0,004$). Генотиповий аналіз показав асоціацію виявлених частко-

Таблиця 2

Результати сукупного генетичного та клінічного аналізу чоловіків з генітальною формою МВ

ТРБМ генотип	Кількість випадків	Клінічні дані
F508del/ 5T алель G542X/ 5T алель	2	Аспермія, непрохідність сім'явивідних протоків
F508del/ 5T алель	2	Аспермія, знижений об'єм, зменшений рН та збільшена в'язкість еякуляту
F508del/ 5T алель	1	Аспермія, підвищений рівень хлоридів у поті
F508del/ —	2	Аспермія, непрохідність сім'явивідних протоків
F508del/ —	1	Аспермія, непрохідність сім'явивідних протоків, підвищений рівень хлоридів у поті
F508del/ —	2	Азооспермія, знижений об'єм, збільшена в'язкість та знижений рН еякуляту
— / 5T алель	2	Аспермія, непрохідність сім'явивідних протоків
—/—	1	Аспермія, непрохідність сім'явивідних протоків, підвищений рівень хлоридів у поті

Частота та спектр виявлених часткових делецій AZFc регіону Y-хромосоми

Групи пацієнтів	Тип часткових делецій	Частота, %	Характер порушень сперматогенезу
Неплідні чоловіки	gr/gr	2,50	азооспермія олігозооспермія олігоастенотератозооспермія олігоастенозооспермія астенотератозооспермія
	b2/b3	4,50	аспермія азооспермія астеноспермія астенотератозооспермія олігоастенотератозооспермія
	sY1201	1,00	азооспермія тератозооспермія
Фертильні чоловіки	0	0	-

вих делецій з широким спектром порушень процесів сперматогенезу від аспермії до помірної астенотератозооспермії (табл.3) [5].

Виходячи з результатів роботи, для встановлення можливих генетичних причин непліддя, пропонуємо наступний алгоритм поетапних досліджень (рис.1). Використання такого підходу для встановлення етіології порушення сперматогенезу дозволить поставити коректний діагноз, виключити зайві обстеження, уникнути непотрібного дороговартісного лікування, своєчасно виявляти сім'ї високого ризику щодо ре-

продуктивних втрат та підібрати коректні підходи під час застосування допоміжних репродуктивних технологій.

Висновки

1. Аномалії каріотипу в обстежуваній групі неплідних чоловіків виявлено у 8,25% випадків. Всі аномалії каріотипу асоціювалися з важкими порушеннями процесів сперматогенезу.
2. У групі неплідних чоловіків у 7,25% випадків діагностовано широкий спектр мікроделецій Y хромосоми у переважній більшості при кількості

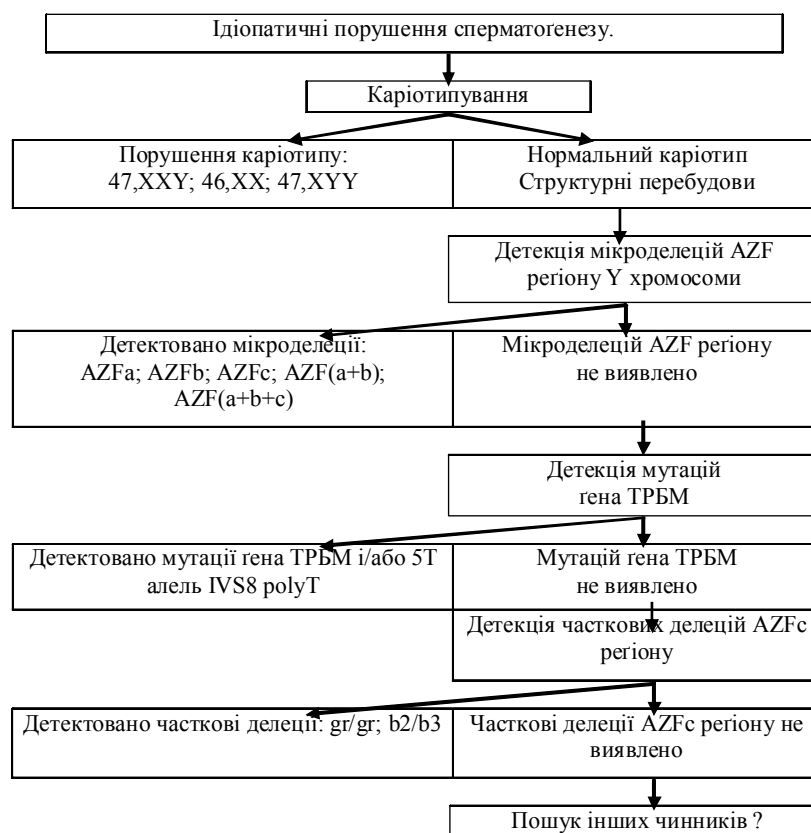


Рис. 1

Алгоритм поетапних досліджень у чоловіків з ідіопатичними порушеннями сперматогенезу

сперматозоїдів в еякуляті <5млн/мл.

3. У групі неплідних чоловіків з підозрою на генітальну форму муковісцидозу в 12,04% верифіковано чоловіче непліддя, зумовлене мутаціями гена ТРБМ.

4. Часткові делеції AZFc регіону Y хромосоми діагностовано у 8,00% неплідних чоловіків за цілковитої відсутності їх у контрольній групі плідних чоловіків.

5. На підставі отриманих результатів запропоновано алгоритм поетапних генетичних досліджень у чоловіків з ідіопатичним непліддям.

Література

- Атраментова Л. А. Статистические методы в биологии: [учебн. для студ. высш. учеб. зав.] / Л. А. Атраментова, О. М. Утевская. - Горловка: Ліхтар, 2008. - 248с.
- Зерова-Любимова Т. Е. Цитогенетичні методи дослідження хромосом людини // Т. Е. Зерова-Любимова, Н. Г. Горovenko // Методичні рекомендації. - Київ., 2003. - 23с.
- Молекулярно-генетичний аналіз дефекта гена AZF Y-хромосоми та гена ТРБМ при чоловічому безплідді / О. А. Фесай, В. М. Пампуха, О. О. Соловйов [і авт.] // Біополімери і клітина. - 2008. - Т. 24, № 3. - Р. 231-237.
- Пат. 32044 UA, МПК G01N33/49 (2006.01) Спосіб виділення ДНК з лейкоцитів периферійної крові / Макух Г. В., Заставна Д.В., Тиркус М. Я. [та ін.], заявник ДУ "Інститут спадкової патології АМНУ". - № u200801896; заявл. 14.02.2008; опубл. 25.04.2008, Бюл. №8.
- Тиркус М. Я. Внесок генетичних чинників у структуру ідіопатичного непліддя чоловіків Західного регіону України: автореф. дис. на здобуття наук. ступеня канд. біол. наук: спец. 03.00.15. - Харків, 2011. - 20 с.
- A high frequency of the Cystic Fibrosis 2184insA mutation in Western Ukraine: Genotype-phenotype correlations, relevance for newborn screening and genetic testing / H. Makukh, M. Tyrkus, L. Bober [et al.] // Journal of Cystic Fibrosis. - 2010. - Vol. 9, № 5. - P.371-375
- AZFc region partial deletions the Y chromosome in czech fertility men / P. Norambuena, A. Stambergova, T. Piskackova [et al.] // European Andrology. - 2008. - Vol. 8, № 1. - P.49
- Best practice guidelines for molecular genetic diagnosis of cystic fibrosis and CFTR-related disorders - updated European recommendations / E. Dequeker1, M. Stuhrmann, M. A. Morris // European Journal of Human Genetics. - 2009. - Vol. 17. - P. 51-65.
- Clinical consequences of microdeletions of the Y chromosome: the extended Münster experience / M. Simoni, F. T?ttelmann, J. Gromoll [et al.] // Reproductive Bio Medicine Online. - 2008. - Vol.16, № 2. - P. 289-303.
- Consensus on the use and interpretation of cystic fibrosis mutation analysis in clinical practice / C. Castellani, H. Cuppens, M. Macek [et al.] // Journal of Cystic Fibrosis. - 2008. - Vol. 7. - P. 179-196.
- Gene polymorphisms and male infertility - a meta-analysis and literature review / F. T?ttelmann, E. R. De Meyts, E. Nieschlag [et al.] // Reprod Biomed Online. - 2007.- Vol. 15. - P. 643-658.
- Guidelines on Male Infertility / G.R. Dohle, A. Jungwirth, G. Colpi [et al.] // European Association of Urology. - 2007.- P. 1-70.
- Krausz C. Y chromosome and male infertility / C. Krausz, S. D. Innocenti // Frontiers in Bioscience. - 2006. - Vol. 11. - P. 3049 - 3061.
- PartialAZFc deletions and duplications: clinical correlates in the Italian population / C.Giachini, I. Laface, E. Guarducci [et al.] // Human Genetics. - 2008. - Vol. 124.- P. 399-410.
- Simoni M. EAA/EMQN best practice guidelines for molecular diagnosis of Y-chromosomal microdeletions / M. Simoni, E. Bakker, C. Krausz // International Journal of Andrology. - 2004. - Vol. 27.- P. 240-249.