

ТИРКУС М. Я.

ДУ «Інститут спадкової патології АМН України»

Україна, 79000, Львів, вул. ЛИСЕНКА, 31а, e-mail: tyrkus.m@ihp.lviv.ua

ЧАСТОТА І СПЕКТР МІКРОДЕЛЕЦІЙ Y-ХРОМОСОМИ У ЧОЛОВІКІВ З РІЗНИМИ ФОРМАМИ ПОРУШЕННЯ СПЕРМАТОГЕНЕЗУ

Сперматогенез - складний багатостадійний процес в 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 частих (мажорних) генетичних причин непліддя у чоловіків при важких формах порушення сперматогенезу.

Зокрема, на довгому плечі Y-хромосоми (Yq) в проксимальній еухроматиновій її ділянці містяться гени фактору азооспермії (AZF- регіон), які відповідають за нормальний сперматогенез. Делеції AZF- регіону супроводжується важкими порушенням фертильності [1].

Вперше роль делецій локусу Yq11 в етіології порушення процесів сперматогенезу було показано в 1976 р. Tierolo і Zuffardi [2]. Подальші цитогенетичні та молекулярно-генетичні дослідження дозволили за допомогою Sts-технології побудувати детальну карту Y-хромосоми, що включає 43 делеційні інтервали та підтвердити наявність в 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 по мірі поглиблення порушень процесів сперматогенезу: мікрodelеції AZF локусу Y-хромосоми виявлені у 5-10% чоловіків з олігозооспермією, в той час, як у чоловіків з азооспермією, що передбачає складніші порушення, цей показник сягає 10-15% [4,5].

У 1996 р. 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. Зараз в літературі широко дискутується взаємозв'язок між чоловічою інфертильністю та частотою і спектром мікрodelецій AZF регіону Y-хромосоми. Зокрема, вважається, що найчастіше при чоловічому неплідді зустрічаються делеції локуса AZFc, але найважчими клінічними проявами супроводжуються мікрodelеції, що захоплюють субрегіони AZFa і AZFb [7].

Отже, метою даної роботи було встановити частоту та спектр мікрodelецій AZF регіону Y-хромосоми серед чоловіків з різними формами порушення сперматогенезу.

Матеріали та методи

Досліджувану групу склали 300 чоловіків із різними формами порушення сперматогенезу. Обстежувані скеровувалися у Львівський міжобласний медико-генетичний центр з приводу неплідного шлюбу. Генетичним дослідженням передували дослідження показників сперматогенезу. Всі досліджувані мали порушення показників спермограми різного ступеня важкості. Контроль складав 50 здорових фертильних чоловіків.

ДНК виділяли з периферійної крові методом висолювання. Молекулярно-генетичні дослідження гена SRY та мікрodelецій AZFa, AZFb та AZFc регіону проводили в наступних STS локусах: sY84, sY86, sY127, sY134, sY254, sY255 за допомогою двох мультилокусних реакції для вищевказаних STS локусів та контрольного фрагменту SRY [8].

Ампліфікацію послідовностей ДНК *in vitro* проводили, використовуючи метод полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР) [9]. ПЛР проводили в автоматичному режимі на

термоциклері „Терцик” („ДНК-технологія”, Росія), використовували олігонуклеотидні праймери та суміш dDNTP („Fermentas”, Вільнюс, Литва), 5х кратний реакційний буфер та термостабільну ДияТак-полімерази виробництва фірми “ДНК-технологии” (м. Москва, Росія).

Проводили 35циклів ПЛР в наступному режимі: активація-15хв (95°C), денатурація ДНК (94°C) 30сек., відпал праймерів (57°C) 90сек. і синтезу ДНК (72°C) 60 сек. Аналіз продуктів ПЛР проводили шляхом електрофорезу в 2% агарозному гелі та сканували електрофореграму на ультрафіолетовому транслюмінаторі[8].

Результати та обговорення

Попередньо слід зазначити, що всім обстежуваним чоловікам з порушеними параметрами спермограми проводили каріотипування. Нижче представлені результати молекулярно-генетичних досліджень стосувалися чоловіків із нормальним каріотипом.

На підставі результатів спермологічних досліджень обстежувані чоловіки були розділені на 3 групи. Першу групу склало 120 осіб, серед них 65 осіб з аспермією (відсутність в еякуляті сперматозоїдів та клітин сперматогенезу) та 45 осіб з азооспермією (відсутність сперматозоїдів у еякуляті). Другу групу склало 80 осіб, серед них 40 осіб з важкою олігозооспермією (кількість сперматозоїдів менше 5 млн/мл) та 40 осіб з олігоастенотератозооспермією, а третю – 100 осіб з іншими формами патозооспермії (при кількості сперматозоїдів більше 5 млн/мл).

В результаті роботи проведено детекцію AZFa-, AZFb-, AZFc-регіонів AZF-локусу довгого плеча Y-хромосоми та SRV-гена короткого плеча Y-хромосоми у всіх досліджуваних групах. Дослідження кожної проби проводили не менш як у двох повторях. Відсутність на електрофореграмі певних фрагментів свідчила про наявність мікрodelецій у відповідних локусах. У даній роботі детекція гена SRV служила як для внутрішнього контролю реакції, так і для визначення наявності Y-хромосоми. З метою уникнення псевдонегативних результатів, нами проведено дослідження даного зразка ДНК для генів розташованих на аутосомах, що дало позитивний синтез.

Отримані результати засвідчили, що у 21 пацієнта виявлено мікрodelеції Y-хромосоми, що складає 7% від всіх (300) обстежених чоловіків. При цьому виявлений наступним спектром мутацій: мікрodelеції субрегіону AZFa виявлено у однієї особи (4,8%), субрегіону AZFb - у двох осіб (9,5%), субрегіонів AZF(b+c) – у шести осіб (28,6%), мікрodelеції субрегіону AZFc виявлено у десяти осіб (47,6%), у двох осіб встановлено відсутність усієї послідовності AZF(a+v+c) Y-хромосоми (9,5%).

Отже, як видно з представлених результатів (таблиця), найчастіше ушкоджувався субрегіон AZFc. Назагал, відсутність AZFc субрегіону встановлено у 18 осіб. Тобто ця мікрodelеція виявлена у 85,7% пацієнтів із загальної (21 пацієнт) групи з діагностованими мікрodelеціями Y-хромосоми. Наші результати принципово співпадають із результатами інших дослідників[10], згідно яких порушення у AZFc ділянці є найрозповсюдженішими.

Підсумовуючи отримані результати щодо частоти мікрodelецій Y-хромосоми залежно від важкості порушень процесів сперматогенезу, очевидно, що найчастіше мікрodelеції виявляли у групі пацієнтів з аспермією та азооспермією (всього 14 чоловік). Значно рідше мікрodelеції виявляли в групі пацієнтів з олігозооспермією та олігоастенотератозооспермією (всього 6 чоловік). І лише в одного пацієнта з третьої групи виявлені мікрodelеції Y-хромосоми. У контрольній групі мікрodelеції Y-хромосоми знайдено не було[5,11]. Частота детекції мікрodelецій Y-хромосоми серед всіх обстежених інфертильних чоловіків склала 7%. Зведені результати досліджень наведені в таблиці.

Таблиця

Частота та спектр мікрodelецій AZF регіону в досліджуваних групах чоловіків

Групи пацієнтів	Кількість обстежених	Кількість знайдених	Спектр знайдених
-----------------	----------------------	---------------------	------------------

	чоловіків	мікрodelецій	мікрodelецій
1. Аспермія Азооспермія	65 55	7(10,8%) 7(12,7%)	AZFa, AZFb, AZFc, AZF(b+c), AZF(a+b+c)
2. Олігозооспермія Олігоастенотератозооспермія	40 40	3(7,5%) 3(7,5%)	AZFc
3. Різні форми патоспермії (к-сть сперматозоїдів більше 5млн/мл)	100	1(1%)	AZFc
Всього пацієнтів 1-3 групи (інфертильні чоловіки)	300	21(7%)	AZFa, AZFb, AZFc, AZF(b+c), AZF(a+b+c)
Контрольна група (фертильні чоловіки)	50	0(0%)	—————

При вивченні спектру мікрodelецій AZF регіону в обстежуваних групах пацієнтів з'ясувалося, що лише в першій групі (пацієнти з аспермією/азооспермією) діагностовано весь спектр мікрodelецій, а саме: мікрodelеції субрегіонів AZFa, AZFb, AZF(b+c) та AZF(a+b+c). В другій та третій групах виявлено мікрodelеції лише субрегіону AZFc. Отримані результати підтверджують, по-перше, тезу про те, що найважчими клінічними проявами супроводжуються мікрodelеції, що захоплюють субрегіони AZFa і AZFb і по-друге те, що найчастіше при порушених параметрах сперматогенезу зустрічаються мікрodelеції субрегіону AZFc, причому, при ураженнях сперматогенезу різного ступеня [12].

Отже, молекулярно-генетичне дослідження мікрodelецій Y-хромосоми дозволяє зрозуміти причину порушення сперматогенезу, поліпшити диференційну діагностику і має прогностичне значення.

Висновки

1. Серед всіх обстежених інфертильних чоловіків частота мікрodelецій Y-хромосоми становить 7%, причому, найчастіше мікрodelеції AZF регіону виявляються у чоловіків з аспермією та азооспермією, частота яких становить 10,8% та 12,7% відповідно.

2. Мікрodelеції субрегіонів AZFa та AZFb зустрічались виключно в пацієнтів з аспермією та азооспермією, мікрodelеції AZFc регіону виявлялись у переважної більшості обстежених чоловіків з порушеннями процесів сперматогенезу незалежно від ступеня таких порушень.

3. Отримані результати вказують на вагомий внесок генетичної компоненти у порушеннях сперматогенезу та передбачають необхідність проведення цих досліджень в усіх випадках порушення сперматогенезу при кількості сперматозоїдів 0- 5 млн/мл.

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.- Vol. 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.- Vol. 34.- P.119-124.

3. *Vollrath D., Foote S., Hilton A.* et al. The human Y chromosome: a 43-internal map based on naturally occurring deletions // Science. - 1992. - Vol. 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. —Vol. 16, № 8. - P. 1543-1547.

5. *Simoni M., Bakker E., Eurlings M.* et al. Laboratory guidelines for molecular diagnosis of Y-chromosomal microdeletion // Int. J. Androl.- 1999. - Vol. 22. - P. 292-299.

6. *Vogt P.H., Edelmann A., Kirsch S. et al.* Human Y chromosome azoospermia factors (AZF) mapped to different subregions in Yq11. // *Hum Mol Genet.*- 1996.-Vol. 5.-P. 933–943.
7. *Krausz C., Forti G. & McElreavey K.* The Y chromosome and male fertility and infertility. // *International Journal of Andrology.* -2003.- Vol. 26.-P.70-75.
8. *Simoni M., Bakker E., Krausz C.* EAA/EMQN best practice guidelines for molecular diagnosis of y-chromosomal microdeletions // *International J. of Andrologi.*- 2004.- No 27.- P. 240-249.
9. *Маниатис Т., Фриз Е.Е, Сэмбрук Ж.* Молекулярное клонирование.- М. Мир.- 1985.- С.420.
10. *Simoni M., Bakker E., Krausz C.* EAA/EMQN best practice guidelines for molecular diagnosis of y-chromosomal microdeletions // *International J. of Andrologi.*- 2004.- No 27.- P. 240-249.
11. *Черных В.Б., Курило Л.Ф., Штлейко Л.В.* и авт. Анализ микроделеций в локусе AZF у мужчин с бесплодием: совместный опыт исследований. // *Медицинская генетика.*-2003.- Т. 2. № 8. С. 367-379
12. *Maurer, B. & Simoni, M.* Y chromosome microdeletion screening in infertile men. // *Journal of Endocrinological Investigation.* -2000.- Vol. 23.- P. 664-670.

Резюме

Отримані результати молекулярно-генетичних досліджень свідчать про те, що мікроделеції AZF локусу Y-хромосоми є однією з найбільш частих (мажорних) генетичних причин непліддя у чоловіків при важких формах порушення сперматогенезу. Серед всіх обстежених інфертильних чоловіків частота мікроделецій Y-хромосоми становить 7%, причому, найчастіше мікроделеції AZF регіону виявляються у чоловіків з аспермією та азооспермією, частота яких становить 10,8% та 12,7% відповідно.

Полученные результаты молекулярно-генетических исследований свидетельствуют о том, что микроделеции AZF локусу Y-хромосоми являются одной из наиболее частых (мажорных) генетических причин бесплодия у мужчин при тяжелых формах нарушения сперматогенеза. Среди всех обследованных инфертильных мужчин частота микроделеций Y-хромосоми составляет 7%, причем, чаще всего микроделеции AZF региона обнаруживали у мужчин с аспермией и азооспермией, частота которых составляет 10,8% и 12,7% соответственно.

The obtained results of molecular-genetic researches testify that Y-chromosome AZF locus microdeletions are one of the major genetic causes of infertility in males with severe forms of spermatogenesis failure. Among all studied infertile men Y-chromosome microdeletions frequency was 7%, thus, AZF region microdeletions mostly were found in males with aspermia and azoospermia. Their frequencies were 10,8% and 12,7% accordingly.

ТКАЧОВА Д.Л., ДУГАН О.М.

Національний технічний університет України «КПІ»,

Україна, 03056, м. Київ, пр. Перемоги, 37, e-mail: diotech@ntu-kpi.kiev.ua

ПОТЕНЦІЙНА МУТАГЕННА ДІЯ КОПЧЕНИХ М'ЯСОПРОДУКТІВ

Попередження або гальмування небажаного мікробіологічного псування м'яса і м'ясних продуктів досягається шляхом застосування різноманітних способів консервування із застосуванням дії різних зберігаючих факторів (бар'єрів): фізичних (високі і низькі температури, іонізуюче випромінювання, ультрафіолетове випромінювання, упаковки і захисних покриттів); хімічних (використання