

Опубликовано: *Материалы XIV международной заочной научно-практической конференции «Научная дискуссия: вопросы медицины».*- Москва.- 2013.- С.24-30.

Молекулярно-генетический анализ Y хромосомы в алгоритме комплексного обследования и лечения тяжелых форм мужского бесплодия

Машкин Анатолий Игоревич
студент лечебного факультета БГМУ, г. Минск

Филимоненкова Вероника Юрьевна
студентка лечебного факультета БГМУ, г. Минск

Юшко Евгений Иванович
научный руководитель, канд. мед. наук, доцент кафедры Урологии,
Белорусский Государственный Медицинский Университет, г. Минск

В ряде случаев бесплодие обусловлено азооспермией, которая выявляется у 4-6% [1,6] инфертильных мужчин.

Принято различать 2 основных типа азооспермии: необструктивную (секреторное бесплодие) и обструктивную (эскреторное бесплодие). Необструктивная азооспермия связана с различными нарушениями сперматогенеза, при этом семявыносящие пути остаются проходимыми. В эякуляте могут выявляться клетки-предшественницы (сперматоциты, сперматиды и др.). Как правило, факторами, приводящими к необструктивной азооспермии являются эндокринные нарушения, недоразвитие гениталий, генетические нарушения (микроделеции AZF (Azoospermia Factor) локуса Y хромосомы, мутация гена муковисцидоза).

Одной из наиболее тяжелых патологий, вызывающих азооспермию, являются: хромосомный дисбаланс, мутации на хромосомном или генном уровне. Мутации генов, контролирующих этапы сперматогенеза, могут приводить к блоку сперматогенеза, проявляясь в диапазоне от легкого

снижения сперматогенной активности до полного отсутствия половых клеток в семенных канальцах (синдром «только клетки Сертоли»), нарушению подвижности, морфологических и фертильных свойств сперматозоидов. Примером подобной патологии являются микроделеции AZF локуса Y хромосомы.

Микроделеция Y хромосомы – это выпадение определенных участков Y хромосомы - AZF локуса (фактора азооспермии). AZF locus находится в длинном плече Y-хромосомы (q11). Гены, расположенные в этом локусе, играют важную роль в процессе сперматогенеза. Микроделеции локуса AZF [9-12] хромосомы Y обнаруживаются в среднем в 10-15% случаев азооспермии и в 5-10% случаев олигозооспермии тяжелой степени [7] и обуславливают нарушения сперматогенеза и бесплодие у мужчин. AZF-locus содержит три неперекрывающихся субрегиона: AZFa, AZFb и AZFc, которые содержат ряд критических генов [13], мутации которых приводят к азооспермии или олигозооспермии тяжелой степени. Делеции AZFa- и AZFb-субрегионов ассоциированы с невозможностью получения зрелых половых клеток, тогда как у пациентов с утратой субрегиона AZFc примерно в 71% случаев удается получить зрелые сперматозоиды. У пациентов с нормозооспермией в некоторых случаях так же отмечено обнаружение делеций, захватывающих AZFc-субрегион. У мужчин с AZF-микроделециями часто отмечается прогрессирование нарушений сперматогенеза в связи с чем, таким пациентам показана криоконсервация полученных сперматозоидов.

Обследование пациентов с азооспермией и олигозооспермией тяжелой степени в отношении состояния AZF локуса Y хромосомы позволяет: установить генетическую причину нарушений сперматогенеза; проводить дифференциальную диагностику бесплодия у мужчин; корректировать терапевтические подходы, избегая "лишнего" лечения; прогнозировать возможность получения сперматозоидов для ICSI (intracytoplasmic sperm injection, интрацитоплазматическая инъекция сперматозоида); прогнозировать возможность получения сперматозоидов при тестикулярной биопсии;

прогнозировать для потомства мужского пола возможность наследования репродуктивных проблем отца; информировать супругов о возможности использования предимплантационной диагностики с целью определения пола и переноса эмбрионов женского пола (после проведения ICSI), для исключения наследования репродуктивных проблем отца.

Таким образом, благодаря использованию такого метода вспомогательных репродуктивных технологий (ВРТ), как ЭКО+ICSI, часть пациентов, имеющих микроделеции AZF локуса Y хромосомы, может иметь собственное потомство. Однако следует иметь в виду, что плоды мужского пола будут наследовать Y-микроделеции. Пациенты должны быть информированы для принятия решения о применении ВРТ. Поэтому перед планируемым ЭКО в рамках обследования супружеской пары мужчинам с азооспермией и олигозооспермией тяжелой степени необходимо провести молекулярно-генетический анализ Y-хромосомы. Делеции AZFa- и AZFb-субрегионов ассоциированы с невозможностью получения зрелых половых клеток, таким образом, проведение диагностической биопсии у данных пациентов не оправдано. Следовательно, данным пациентам необходимо рекомендовать иные пути решения репродуктивных проблем: донорские программы или усыновление. Наличие AZF-микроделений обуславливает неэффективность консервативного лечения, направленного на повышение сперматогенеза (увеличение количества сперматозоидов), однако у лиц с утратой AZFc-субрегиона при подготовке к ВРТ необходима терапия, направленная на коррекцию гормонального и метаболического статуса мужчины для получения морфологически качественных сперматозоидов.

Для дифференциальной диагностики обструктивных и необструктивных форм мужского бесплодия используется рентгенконтрастное исследование проходимости семявыносящих путей, трансуретральная катеттеризация устья семявыносящего протока и др. Конечным этапом является использование пункционной биопсии. Данная процедура носит как диагностический, так и лечебный характер, т.к. при наличии в биоптате единичных сперматозоидов

их можно в дальнейшем использовать при проведении такого метода ВРТ как ICSI. Существует большое разнообразие методов проведения данной процедуры, однако, на наш взгляд наиболее приемлемым и часто используемым является TESA (testicular sperm aspiration) - чрезкожная аспирационная биопсия яичка, в связи с простотой ее выполнения и малоинвазивностью [2,3,4].

Цели и задачи

Целью данной работы стали анализ структуры мужского бесплодия и возможных факторов наступления инфертильного состояния и утяжеления его степени, изучение результатов клинических и лабораторных исследований пациентов с необструктивной азооспермией и оценкой материала, полученного при использовании TESA для повышения эффективности диагностики и лечения у данной категории пациентов.

Задачи:

1. Определить группу пациентов нуждающихся в диагностике генетических факторов, приводящих к мужскому бесплодию.
2. Определить удельный вес пациентов с азооспермией и олигозооспермией тяжелой степени имеющих микроделеции AZF локуса Y хромосомы.
3. Определить категорию пациентов имеющих делеции разных субрегионов AZF-локуса Y- хромосомы связанные с невозможностью получения зрелых сперматозоидов.
4. Определить эффективность диагностической биопсии ткани яичка в качестве лечебной процедуры для проведения ВРТ (ЭКО, ICSI).

Материалы и методы.

Объект исследования мужчины с азооспермией или олигозооспермией тяжелой степени. Безусловно, молекулярно-генетическое исследование необходимо проводить всем мужчинам перед планируемым ICSI. Кроме того, исследование AZF-локуса на наличие микроделений выполнялось у мужчин с показателем количества сперматозоидов менее 5 млн/мл. [8]. Так как чаще

всего микроделеции обнаруживаются у мужчин с идиопатическим бесплодием (бесплодием неясного генеза), то им в первую очередь показано обследование AZF-локуса на наличие микроделений. У части пациентов с микроделециями Y-хромосомы в анамнезе могут быть и другие (негенетические) причины нарушения сперматогенеза, такие как половые инфекции, варикоцеле, крипторхизм, которые сами по себе редко приводят к столь глубоким нарушениям сперматогенеза.

Проводимое комплексное обследование включало методы рекомендованные ВОЗ для диагностики бесплодия [5,15], а при оценке результатов за стандарты принимались нормативные показатели, рекомендованные ВОЗ в 2001 г. [14].

I. Клинические методы:

1. Первичный опрос (сбор анамнеза и изучение представленной медицинской документации).
2. Общее медицинское обследование.
3. Обследование мочеполовой системы (включая пальцевое ректальное исследование предстательной железы и семенных пузырьков).
4. Обследование терапевтом, генетиком, сексопатологом (по показаниям).

II. Лабораторно-диагностические методы:

1. Спермограмма (минимум дважды).
2. Общий и биохимический анализ крови, общий анализ мочи.
3. Определение титра антиспермальных антител (по показаниям).
4. Посткоитальный тест.
5. Медико-генетическое исследование (исследование кариотипа).
6. Микроскопическое исследование секрета простаты и семенных пузырьков.
7. Исследование на ИППП.

8. Гормональный скрининг (фолликулостимулирующий гормон (ФСГ), лютеонизирующий гормон (ЛГ), пролактин (ПРЛ), свободный тестостерон (Т), 17-эстрадиол (Е2)).

9. Ультразвуковое исследование простатовезикулярного комплекса и органов мошонки с обязательным определением объема яичек и исследованием придатков.

10. Тестикулярная биопсия (TESA).

Результаты и их обсуждение.

В основу работы положены результаты, полученные при проведении диагностики и лечения тяжелых форм мужского бесплодия в клинике «Центр репродуктивной медицины» г. Минск, Республика Беларусь.

Диагноз азооспермии (тяжелой олигозооспермии) у исследуемых пациентов устанавливался на основании показателей спермограммы, а проведение комплексного обследования и TESA позволяло подтвердить данный диагноз и уточнить тип азооспермии.

Всего было обследовано на микроделеции AZF-субрегиона 423 пациента.

Из них: 320 мужчин с азооспермией, 103 пациента с единичными сперматозоидами в эякуляте. Микроделеции AZF выявлены у 22 человек (5,2%) из 423 : из 320 пациентов с азооспермией- у 18 человек (5,62%), из 103 пациентов с единичными сперматоцитами- у 4 (3,9%). При оценке гормонального статуса у 16 (88,9%) из 18 человек с азооспермией ФСГ превышал 12, тестостерон был снижен у 14 (77,7%).

Делеция локуса AZF-с наблюдалась у 19 (4,5%) пациентов (из них у 15 пациентов с азооспермией и у 4 с единичными сперматозоидами в эякуляте), делеция AZFb и с локуса у 2 (0,5%), делеция локуса b у 1 (0,2%).

Процедура ЭКО+ICSI выполнялась 4 пациентам из 22 с единичными сперматозоидами в эякуляте, при этом в 2 (50%) случаях наступила беременность, закончившаяся срочными родами (родились девочки).

Диагностическая биопсия по методике TESA проводилась 18 пациентам с азооспермией из 22, у которых были выявлены делеции AZF субрегиона. В

случае сочетания делеции локусов AZFb и c (3 случая) сперматозоиды не получены. В 15 случаях делеции локуса AZF-c у 5 (33,3%) сперматозоиды не получены, у 10 (66,7%) получены единичные сперматозоиды, которые подверглись криоконсервации. Процедура ЭКО+ICSI с использованием криоконсервированного материала проведена 8 пациентам из 10 (2 проходят подготовку). В 3 (37,5%) случаях наступила беременность, из них в 2 случаях- срочные роды, в 1 случае- спонтанный аборт в 7-8 недель.

Выводы.

1. К группе пациентов, нуждающихся в диагностике генетических факторов infertility, следует отнести: всех мужчин с идиопатическим бесплодием, мужчин с азооспермией и тяжелыми формами олигозооспермии.
2. Общее количество мужчин, имеющих делецию AZF- локуса Y-хромосомы составило 22 (5,2%) человека из 423 обследованных.
3. Вероятность отсутствия сперматозоидов при проведении биопсии у мужчин с делециями AZFb ,AZFb+c составила 100%, в случаях с микроделецией локуса c -33,3%
4. Вероятность наступления беременности при проведении ЭКО+ИКСИ при использовании криоконсервированного биоптата у мужчин с микроделециями локуса c составила 37,5%
5. Исследование микроделеций AZF локуса Y-хромосомы у мужчин с тяжелой формой олигоспермии и азооспермии является важным диагностическим и прогностическим критерием, определяющим рациональную тактику лечения, выбор метода преодоления бесплодия и показаний к предимплантационной диагностике пола потомства.

Список литературы:

1. Корякин М.В. Анализ причин мужского бесплодия/ Корякин М.В., Акопян А.С.// Проблемы репродукции. 2000.№5. С.68-74.
2. Кулаков В.И. Лечение женского и мужского бесплодия. Вспомогательные репродуктивные технологии/ Кулаков В.И. [и др.]//М.: МИА,2005.-592 с.
3. Леонов Б.В. Наш опыт применения метода интрацитоплазматической инъекции сперматозоида в программе экстракорпорального оплодотворения и переноса эмбриона в полость матки/ Леонов Б.В. [и др.]//Акушерство и гинекология. 1999.№4. С. 35-38.
4. Нишлаг Э. Андрология. Мужское здоровье и дисфункция репродуктивной системы./ Нишлаг Э., Бере Г.М.// Пер. с англ. МИА, 2005.
5. Тер-Авнесов Г.В. Мужское бесплодие: этиопатогенез, диагностика и лечение/ Тер-Авнесов Г.В.//Москва, 2007. 114 с.
6. Buffat C. ICSI outcomes in obstructive azoospermia: influence of the origin of surgically retrieved spermatozoa and the cause of obstruction/ Buffat C/[et al.]// Human Reproduction 2006 №21(4). P. 1018-1024.
7. Krausz C., McElreavey K. Y chromosome and male infertility. *Frontiers in Bioscience* 1999; 4: 1-8.
8. Simoni M. et al. Laboratory guidelines for molecular diagnosis of Y-chromosomal microdeletion. *Intern J Andrology* 1999; 22: 292-299.
9. 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: 119-124.
10. Vogt P.H., Chandley A.C., Hargreave T.B. et al. Microdeletions in interval 6 of the Y chromosome of males with idiopathic sterility point to disruption of AZF, a human spermatogenesis gene. *Hum Genet* 1992; 89: 491-496.

11. Vogt P.H., Edelmann A., Hirschmann P. et al. The azoospermia factor (AZF) on the human Y chromosome in Yq11: function and analysis in spermatogenesis. *Reprod Fertil Dev* 1995; 7: 685-693.

12. Vogt P.H., Edelmann A., Kirsh S. et al. Human Y chromosome azoospermia factors (AZF) mapped to different subregions in Yq11. *Hum Mol Genet* 1996; 5: 933-943.

13. Vogt P.H. Human chromosome deletions in Yq11, AZF candidate genes and male infertility: history and update. *Mol Hum Reprod* 1998; 4: 739-744.

14. World Health Organization. Laboratory manual for the examination of human semen and sperm-cervical mucus interaction. Cambridge University Press. Cambridge. 2001.

15. World Health Organization. Manual for the standardized investigation and diagnosis of the infertile couple. Cambridge University Press, Cambridge, 1993.
