

MOLECULAR GENETIC ANALYSIS OF MICRODELETIONS OF Y-CHROMOSOME AZF LOCUS

Kairzhanova A.D.¹, Kamalova D.K.¹, Abisheva G.D.¹, Amirgazin A.O.¹,
Shvedyuk V.B.¹, Popova O.A.², Kim G.M.², Shevtsov A.B.¹

National Center for Biotechnology

13/5, Korgalzhyn road, Astana, 010000, Kazakhstan

²PLL «Astana ECOLIFE»

22, Alash road, Astana, 010000, Казахстан

apple_sk@mail.ru

ABSTRACT

Male infertility plays a significant role in reproduction. Although medical therapy can successfully treat ejaculation disorder and impotence, a majority of genetic disorders remain therapeutically intractable. Y-chromosome deletions are the most common causes of male infertility. The distal end of the Y-chromosome long arm bears the locus of azoospermia factor (AZF), which carries genes essential for spermatogenesis. Microdeletions in the Y-chromosome long arm are associated with spermatogenesis disorder and are the most common genetic cause of oligospermia (5-10%) and azoospermia (10-15%). In our study, we analysed microdeletions of the AZF locus, using six STS markers (recommended by the European Association of Andrology), two gene controls for reaction inhibition, and a Y-chromosome control.

We tested DNA samples of 138 male subjects with the developed test system. The distribution results of microdeletions of the Y-chromosome AZF locus were obtained for samples from the Kazakh population. Deletion of the AZF locus was reported in 11% of males with oligospermia and 16% males (7 of 45 subjects) with azoospermia.

Keywords: Y-chromosome, AZF locus, STS markers, PCR, male infertility, microdeletion.

УДК 616.697:575.113

МОЛЕКУЛЯРНО ГЕНЕТИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ МИКРОДЕЛЕЦИЙ AZF ЛОКУСА Y-ХРОМОСОМЫ

Каиржанова А.Д.¹, Камалова Д.К.¹, Абишева Г.Д.¹, Амиргазин А.О.¹,
Шведюк В.Б.¹, Попова О.А.², Ким Г.М.², Шевцов А.Б.¹

¹Национальный центр биотехнологии

Кургальжинское шоссе, 13/5, Астана, 010000, Казахстан

²ТОО «Астана ЭКОЛАЙФ»

шоссе Алаш, 22, Астана, 010000, Казахстан

apple_sk@mail.ru

АБСТРАКТ

Мужское бесплодие играет значительную роль в репродуктологии. Хотя расстройства эякуляции и импотенции могут успешно лечиться в медицинской терапии, многие расстройства генетического происхождения преодолеть невозможно. Микроделеции Y-хромосомы являются наиболее распространенной генетической причиной мужского бесплодия. Дистальный конец длинного плеча Y-хромосомы содержит локус фактора азооспермии (AZF), который содержит гены, необходимые для сперматогенеза. Микроделеции длинного плеча Y-хромосомы связаны с нарушением сперматогенеза, являются наиболее частой генетической причиной олигозооспермии и азооспермии в 5-10 и 10-15% случаев соответственно. В нашем исследовании для поиска микроделетий в локусе AZF в качестве генетических маркеров были выбраны 6 STS маркеров, рекомендованных Европейской ассоциацией андрологов и 2 контрольных гена для контроля ингибирования реакции и наличия Y-хромосомы. Представлены результаты, полученные при тестировании 138 образцов ДНК мужчин с использованием разработанной тест-системы. Описаны результаты распределения микроделетий AZF локуса Y-хромосомы в популяционной выборке Казахстана. У мужчин с олигозооспермией делеции AZF локуса

были обнаружены в 11% случаев. В группе мужчин с азооспермией, общее количество которых составило 45 человек, делеции в субрегионе AZF были обнаружены у 7 мужчин (в 16% случаев).

Ключевые слова: Y-хромосома, AZF локус, STS маркеры, ПЦР, мужское бесплодие, микроделеция.

ВВЕДЕНИЕ

Бесплодие является серьезной проблемой здравоохранения, которая затрагивает 10-15% всех пар репродуктивного возраста в мире [1]. Согласно официальным статистическим данным Казахстана и стран Центральной Азии, за последние годы увеличился процент бесплодных браков. В Казахстане страдают бесплодием почти 15-20% супружеских пар. С этой проблемой сталкивается каждая пятая пара. При этом на долю мужского бесплодия приходится около 50% случаев [2].

Y-хромосома является основной мишенью при исследовании мужского бесплодия, так как содержит гены, имеющие решающее значение в сперматогенезе и в развитии мужских половых желез. Определение точной причины бесплодия, ассоциированного с Y-хромосомой, затруднительно ввиду полиморфизма генетических изменений, от точечных мутаций до протяженных делеций, зачастую затрагивающих область нескольких генов [3]. Кроме того, один и тот же фенотип может быть обусловлен различным спектром делеций и мутаций.

Микроделеции AZF локуса Y-хромосомы являются одной из главных генетических причин мужского бесплодия, сопряженного с тяжелыми формами патозооспермии, такие как азооспермия и олигоспермия. Наибольший интерес исследователей сосредоточен на локусе Yq11, который содержит фрагмент генома, называемый областью фактора азооспермии (AZF область). Данный участок содержит гены, участвующие в росте и развитии сперматозоидов. Локус AZF содержит три субрегиона: AZFa, AZFb, AZFc [4]. Для каждого из них выявлены гены-кандидаты, участвующие в контроле сперматогенеза, а также их X-сцепленные и/или аутосомные гомологи. Делеции, имеющие клинические проявления в виде тяжелой олигозооспермии и азооспермии, могут затрагивать один или более AZF локусов.

Микроделеция AZFa охватывает регион протяженностью около 1,1 миллионов п.н., расположенный в проксимальной части Yq (Yq11.21) [5]. Микроделеция AZFa возникает в результате неаллельной гомологичной рекомбинации между последовательностями двух человеческих эндогенных ретровирусов, фланкирующих данный участок [6]. Делеции генов AZFa области вызывают синдром «только клетки Сертоли», который характеризуется состоянием полного отсутствия мужских герминативных клеток, азооспермию, гораздо реже наблюдается снижение сперматогенной активности [7]. В регионе AZFa расположены два основных гена *USP9Y* и *DBY* и не менее 11 псевдогенов [8]. *DBY* – главный ген расположен в AZFa области, играет большую роль в бесплодии, так как локализуется в семенниках и участвует в развитии премейотических зародышевых клеток [9]. Ген *USP9Y* также участвует в сперматогенезе. Укорочение или делеция гена *USP9Y* вызывает азооспермию, олигозооспермию или олигоастенозооспермию [10, 11]. На доли микроделений субрегиона AZFa приходится только 5% от всех микроделений Y-хромосомы.

Делеция AZFb охватывает регион, картированный в пределах ~ 18.1-24.7 млн. пар MSY, в общей сложности удаляется участок протяженностью около 6,23 млн. п.н. [5]. Локус AZFb состоит из прямых и инвертированных высокоповторяющихся последовательностей, собранных в палиндромы, однако большая часть региона содержит последовательности, представленные в единичной копии. AZFb регион содержит несколько копий генных семейств *RBM1 – RBM6*, *XKRY*- и *CDY*-копии, а также гены *PRY*, *EIF-1A*, *SMCY* [12]. Гены *CDY1* и *CDY2* являются тестис-специфическими, кодируемые ими белки содержат хроматин связывающие и каталитические домены, способные вступать во взаимодействие с хроматином, модифицируя структуры ДНК и нуклеопротеидов, связанных с ДНК [13]. Гены *PRY* участвуют в регуляции апоптоза, в результате чего удаляются аномальные сперматозоиды. В случаях, когда все гены региона AZFb, за исключением *RBMУ* и *PRY*, делетируются у пациентов, наблюдается гипоспермия. Однако если делетирование затронет также гены *RBMУ* и *PRY*, сперматогенез будет нарушен полностью [14]. Гены *RBMУ* относятся к семейству многокопийных генов (30-40 копий), некоторые из которых являются псевдогенами. Гены и псевдогены семейства *RBMУ* подразделяют на несколько подсемейств (*RBMУ1* до *RBMУ6*). Делеции копии или всех копий гена *RBMУ* в AZFb выявляют у мужчин с азооспермией или тяжелой олигозооспермией, что позволяет сделать вывод о связи этой делеции с нарушением сперматогенеза во время мейоза [15]. На долю микроделений AZFb приходится до 16% всех микроделений.

Субрегион AZFc находится в дистальной части 6 интервала (6C-6E) Y-хромосомы. Микроделеции данного субрегиона приводят к 12% необструктивной азооспермии и 6% тяжелой олигозооспермии [16]. Делеция AZFc охватывает регион, картированный в пределах ~ 23 до 26.8 млн. пар MSY региона, в общей сложности удаляется участок протяженностью около 3,5 млн. п.н. Как и AZFb имеет ампликонную структуру строения. В AZFc регионе локализованы в среднем 4 копии гена *DAZ* (основной ген-кандидат на «фактор азооспермии»), копии *RBM*. Кроме того, картированы такие как *CDY1* (chromodomain Y 1), *BPY2* (основной белок Y 2), *PRY* (PTA-BL, связывающий Y) и *TTY2* (testis transcript Y 2, транскрипт семенников) [17]. Ампликонная структура *AZFc* приводит к образованию микроделений различного размера, что и объясняет полиморфизм клинических проявлений, от азооспермии до олигозооспермии, иногда с полным сохранением фертильности [18]. Исследования показали, что примерно 65-70% случаев микроделений Y-хромосомы происходят в AZFc области [19-22].

По данным многих исследователей, общая распространенность мутаций AZF локуса хромосомы Y среди мужчин с выраженными отклонениями в показателях спермограммы широко варьирует в различных популяциях – от 1,3 до 38,1%, в среднем этот показатель составляет 7,6% [23-27]. В литературных источниках

мало информации о частоте микроделений в казахстанской популяции. Поэтому целью данного исследования являлась оценка распределения микроделений AZF локуса Y-хромосомы у мужчин, имеющих отклонения от нормы в спермограмме. Исследование было проведено с использованием разработанной тест-системы, в которой для поиска микроделений в локусе AZF используются 6 STS маркеров, рекомендованных Европейской ассоциацией андрологов, и 2 контрольных гена для контроля ингибирования реакции и наличия Y-хромосомы.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Образцы ДНК

Выборка включала образцы цельной крови от мужчин, имеющих прямые показатели для анализа микроделений локуса AZF Y-хромосомы и контрольной группы, мужчины с нормоспермией. В выборку мужчин, имеющих прямые показатели для анализа микроделений локуса AZF Y-хромосомы, включали пациентов по результатам спермограммы, у которых был установлен диагноз азооспермия или олигозооспермия. Общее количество исследуемых мужчин составило 138 человек. На основании результатов спермиологического исследования все мужчины были разделены на 4 группы. В первую группу отобрали 45 пациентов с азооспермией, во вторую – 36 с олигозооспермией, в третью – 17 с другими формами патозооспермии (при количестве сперматозоидов более 5 млн/мл), в четвертую контрольную группу вошли образцы ДНК 40 здоровых (фертильных) мужчин, в спермограмме которых не было выявлено отклонений. Всем участникам объяснялась цель и задачи планируемого исследования. После получения информированного согласия на участие в исследовании всем участникам проводили интервью по специальным анкетам опросникам. У всех участников исследования производился забор образцов биологического материала (цельная кровь) в вакуумные системы забора крови с антикоагулянтом ЭДТА. Забор крови осуществлялся медицинским персоналом.

Выделение ДНК

Для подтверждения чувствительности тест-системы выделение ДНК проводили тремя способами: с использованием разработанного протокола для выделения ДНК из клинического материала, Wizard genomic DNA purification kit (Promega, USA) и методом высаливания [28].

У мужчин с бесплодием, имеющих прямые показатели для анализа микроделений локуса AZF Y-хромосомы, и контрольной группы выделение ДНК проводили методом высаливания.

Концентрацию ДНК определяли спектрофотометрическим методом с использованием спектрофотометра NanoDrop.

Multiplex-PCR

ДНК амплифицировали методом мультиплексной полимеразной цепной реакции. В первой мультиплексной реакции (панель А) амплифицируются 4 STS маркера: sY86-AZFa; sY127-AZFb; sY255-AZFc и для внутреннего контроля амплификации используется ген *ZFY/X*, кодирующий белок цинковых пальцев, имеющий гомолога на X-хромосоме. Во второй мультиплексной реакции (панель G) амплифицируются 5 STS маркеров: sY84-AZFa; sY134-AZFb; sY254-AZFc; для контроля присутствия Y-хромосомы в образце используется *SRY* ген, для внутреннего контроля амплификации используются гены *ZFY/X*.

ПЦР реакция выполнена в общем объеме 30 мкл. В состав реакционной смеси входили: смесь праймеров соответствующей панели; ДНК 50 нг; 0,2 мМ каждого дНТФ; 1-х ПЦР буфер (Fermentas, 75 мМ Tris-HCl (pH 8.8 при 25°C), 20 мМ (NH₄)₂SO₄, 0,01% (v/v) Tween 20); ионы магния 3,0 мМ, 5 нМ тетраметиламмония хлорида, 7% сахарозы, ксилен цианол 10 мг/мл, бетаин – до финальной концентрации 0,2М, 2 единицы Taq ДНК полимеразы. Программа ПЦР амплификации включала: горячий старт 95°C, длительную денатурацию 95°C в течение 4 минут; 30 циклов: 95°C – 30 секунд, 60°C – 1 минута, 72°C – 1 минута 30 секунд; финальная элонгация 72°C – 10 минут.

Электрофоретический анализ продуктов амплификации

Анализ ПЦР продуктов проводили методом электрофоретического разделения фрагментов ДНК в 3% агарозном геле, в присутствии интеркалирующего агента – бромистого этидия. Электрофорез проводили в камере для горизонтального электрофореза PowerPac с источником тока BioRad Electrophoretic bath (Bio-Rad, США). В качестве электродного буфера использовали 1x TAE-буфер (40 мМ Трис-основной, 20 мМ уксусной кислоты, 1 мМ ЭДТА).

Документирование полученных результатов проводили, используя систему документаций гелей Gel Doc, (Bio-Rad, США), с программным обеспечением QuantityOne (Bio-Rad, США). Размеры молекул анализируемых образцов ДНК определяли путем сопоставления их электрофоретической подвижности в геле с подвижностью маркеров – фрагмент ДНК известной молекулярной массы. В качестве маркера молекулярных масс использовали "DNA Ladder 1kb" (Ferments).

Дизайн и конструирование праймеров

Подбор специфических праймеров проводили с использованием программ Primer Select (DNASTAR) и BioEdit. В качестве мишеней были использованы STS маркеры, рекомендованные Европейской ассоциацией

андрологов [29]: AZFa-sY86 и sY84, AZFb-sY127 и sY134, AZFc-sY254 и sY255, для контроля фрагмента короткого плеча Y-хромосомы была выбрана нуклеотидная последовательность *SRY* гена, а в качестве внутреннего контроля была использована нуклеотидная последовательность *ZFX/ZFY* генов, локализованных на X и Y-хромосомах соответственно.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

В нашем исследовании в качестве генетических маркеров были выбраны 6 STS маркеров, рекомендованных Европейской ассоциацией андрологов для скрининга микроделечий, и 2 контрольных гена для контроля ингибирования реакции и наличия Y-хромосомы. Праймеры обладают близкой расчетной температурой отжига и амплифицируемые фрагменты отличаются по молекулярной массе. Праймеры комбинированы в две панели А и G. Панель А включает в себя 3 пары праймеров к селективным маркерам микроделечий, AZFa (sY86 – размер амплифицируемого продукта 350 пар нуклеотидов (п.н.), AZFb (sY12 – 192 п.н.), AZFc (sY255 – 132 п.н.), в качестве внутреннего контроля использовались праймеры к *ZFX/Y* (591 п.н.). Панель G включала праймеры к маркерам микроделечий AZFa (sY84 – 241 п.н.), AZFb (sY134 – 303 п.н.), AZFc (sY254 – 162 п.н.), и для контроля фрагмента короткого плеча Y-хромосомы были использованы праймеры, подобранные к STS маркеру sY14, локализованному в *SRY* гене (470 п.н.).

Чувствительность тест-системы была подтверждена на образце ДНК мужчины, у которого не были выявлены делеции AZF локуса Y-хромосомы и образце женщины. Выделение ДНК проводили тремя методами, как описано ранее. Концентрация ДНК варьировала от 20 до 1000 нг в реакционной смеси (таблица 1).

Таблица 1. Концентрация ДНК при оценке чувствительности

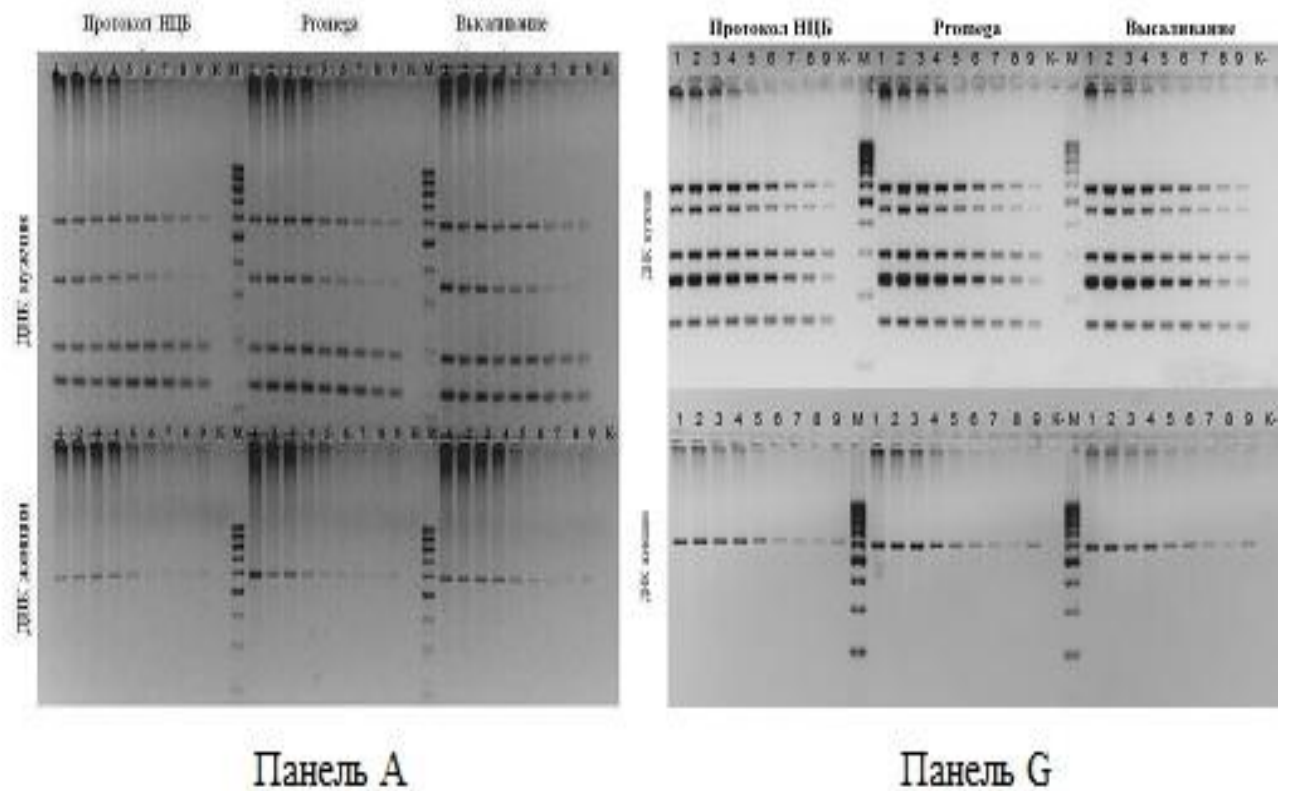
Table 1. DNA concentration at sensitivity assessment

Номер п/п Position number	ДНК в реакционной смеси нг. DNA in the reaction mixture ng	Номер п/п Position number	ДНК в реакционной смеси нг DNA in the reaction mixture ng
1	1000	6	120
2	750	7	60
3	600	8	40
4	400	9	20
5	160	К-	ТЕ-буфер TE-buffer

Результаты электрофоретического учета приведены на рисунке 1.

При постановке ПЦР с разведениями ДНК с использованием праймеров панели А чувствительность составила 40 нг в реакционной смеси, о чем свидетельствует наличие четко интерпретируемых ПЦР продуктов в электрофореграмме. Чувствительность панели G составила не менее 20 нг, о чем свидетельствует наличие четко интерпретируемых ПЦР продуктов в электрофореграмме (рисунок 1).

Чувствительность тест-системы позволяет использовать ее в медицинской диагностике при использовании различных систем выделения ДНК, что позволяет применить отработанный способ выделения ДНК.



1-9 – образцы ДНК в концентрации согласно таблице 1; «К» – отрицательный контрольный образец; М – маркер молекулярного веса от 100 до 1000 п.н. шаг 100 п.н.

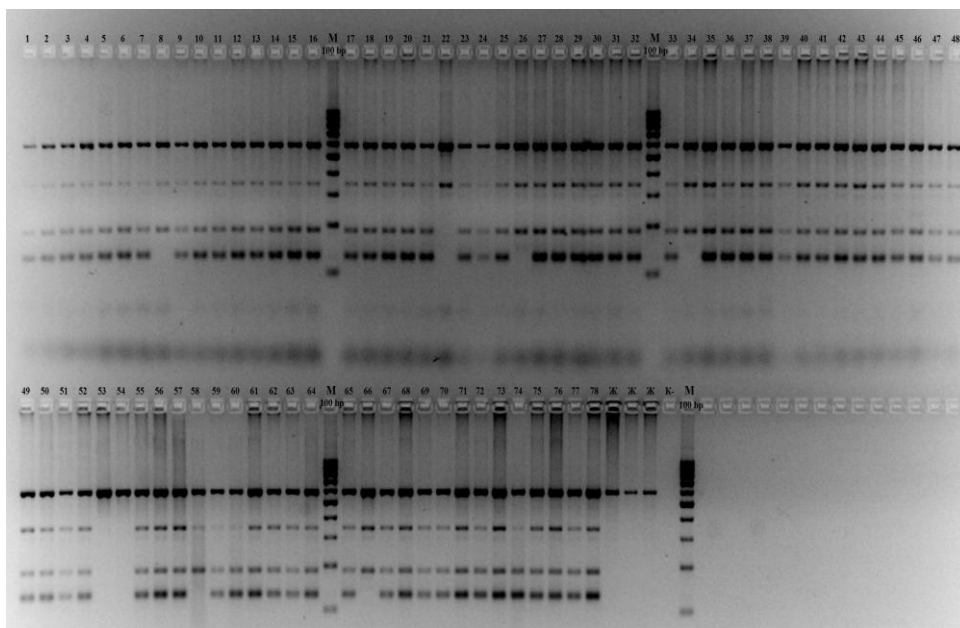
Рис. 1. Электрофореграммы оценки чувствительности панелей А и G

1-9 – DNA samples have concentration in accordance with the Table 1. “K” – negative control sample; M – DNA molecular weight marker (100-1000 bp) with 100 bp step.

Fig. 1. Electrophoregram of the sensitivity assessment panel A and G

Анализ микроделечий Y-хромосомы

Патерный профиль ПЦР продуктов двух панелей А и G, получаемый в результате амплификации 6 STS маркеров и 2 контрольных генов, легко интерпретируется при электрофоретическом учете результатов (рисунок 2 и 3).

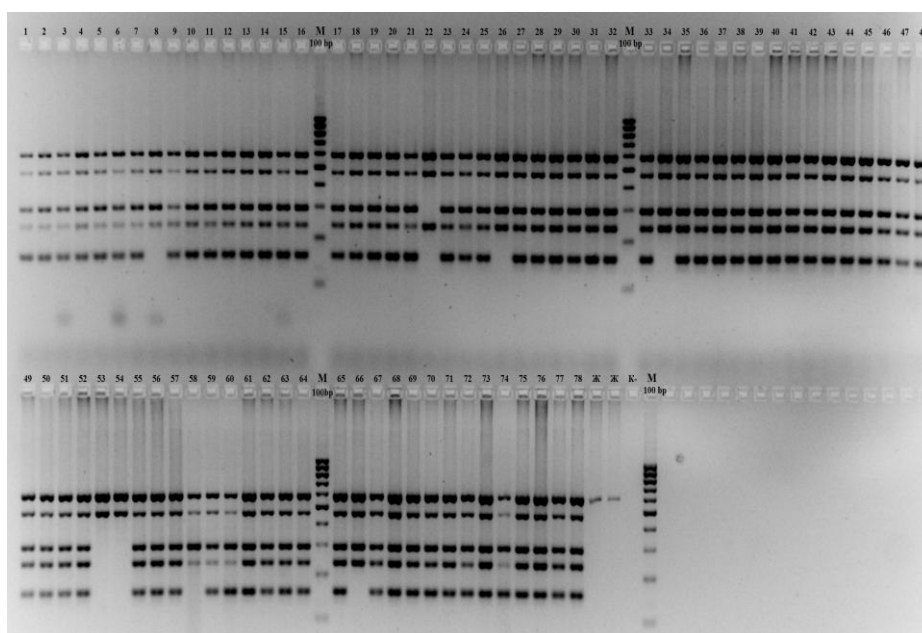


1-78 – образцы ДНК мужчин; Ж – образцы ДНК женщин; М – маркер молекулярного веса от 100 до 1000 п.н. шаг 100 п.н.

Рис. 2. Электрофореграмма оценки специфичности панели А

1-78 – DNA samples of men; Ж – DNA samples of women; М – DNA molecular weight marker (100-1000 bp) with 100 bp step.

Fig. 2. Electrophoregram of the specificity assessment panel A



1-78 – образцы ДНК; Ж – образцы ДНК женщин; М – маркер молекулярного веса от 100 до 1000 п.н. шаг 100 п.н.

Рис. 3. Электрофореграмма оценки специфичности панели G

1-78 – DNA samples of men; Ж – DNA samples of women; М – DNA molecular weight marker (100-1000 bp) with 100bp step.

Fig. 3. Electrophoregram of the specificity assessment panel G

В образцах под номерами 8, 26, 34, 58, 66 в электрофореграммах отсутствуют специфические продукты ПЦР амплификации размером 132 п.н. в панели А и 164 п.н. в панели G, что свидетельствует о делеции локуса AZFc. В образцах 53 и 54 отсутствуют специфические продукты амплификации трех локусов AZFa, AZFb и

AZFc в обеих панелях. В образце 23 отсутствуют специфические продукты амплификации локусов AZFb и AZFc.

В результате молекулярно-генетического исследования у 11 из 98 мужчин (11,2%) с отклонениями от нормоспермии были обнаружены микроделеции в различных локусах AZF региона Y-хромосомы, по меньшей мере, одного из анализируемых STS маркера. Результаты показали, что у 4 из 36 мужчин с олигозооспермией выявлены микроделеции локуса AZFc, что составило 11%. В группе мужчин с азооспермией, общее количество которых составило 45 человек, делеции в субрегионах AZF были обнаружены у 7 мужчин (в 16% случаев), в других формах патозооспермии микроделеции не обнаружено. Результаты также согласуются с большинством исследований, в которых наблюдается высокая частота микроделетий у мужчин с азооспермией, чем у мужчин с олигозооспермией [30-33]. В контрольной группе фертильных мужчин, общее количество которых составило 40 человек, микроделеции AZF локуса не были обнаружены (таблица 2).

Таблица 2. Частота делеций локуса AZF в обследованных группах мужчин

Table 2. Frequency of the AZF locus deletions in the research male groups

Группа пациентов Patients group	Количество обследованных мужчин Number of surveyed men	Число обнаруженных микроделетий AZF региона The number of detected AZF region microdeletions
1. Азооспермия Azoospermia	45	7 (16%)
2. Олигозооспермия Oligozoospermia	36	4 (11%)
3. Другие формы патозооспермии (при количестве сперматозоидов более 5 млн/мл) Other forms of patozoospermia (when the amount of more than 5 million sperm / ml)	17	0 (0%)
4. Контрольная группа Control group	40	0 (0%)
Общее количество обследованных мужчин The total number of surveyed men	138	11(7,9%)

В результате наших исследований было определено, что наиболее часто встречалась микроделеция AZFc субрегиона в 63% (7 мужчин), микроделеция AZFb+c в 10% (1 человек). Делеция AZFc+AZFb+AZFa была обнаружена у 3 человек, что составило 27% от общего числа выявленных микроделетий, в субрегионах AZFa, AZFb микроделеции не выявлены. В нашем исследовании частота микроделетий субрегиона AZFc была выше, чем в других регионах AZF. Этот результат согласуется с большей частью источников, которые указывают, что распространенность микроделетий AZFc высока по сравнению с AZFb и AZFa областей [34-38]. Согласно литературным данным, микроделеция в субрегионе AZFc выявляется в 75-80% случаев; в субрегионах AZFb+c – 20-22%; в субрегионе AZFa – 3-5% случаев. При азооспермии микроделеции в AZF регионе выявляются в 12-15% случаях, при олигозооспермии – в 8-10% случаев [39].

В нашем исследовании частота микроделетий составила 11,2% случаев у мужчин с отклонениями от нормоспермии. Эта частота похожа с той, которая выявлена у пациентов из США (11%), Японии (11,7%) и Туниса (11,8%) [40, 33, 34], в то время она немного выше, чем у пациентов из Индии (7,6%), Нидерландов (8,1%) и Китая (8,6%) [32, 41, 42]. Тем не менее, об очень низкой частоте микроделетии локуса AZF Y-хромосомы сообщалось в исследованиях из Алжира (2%), Словакии (4,6%) и Турции (1,3%) [30, 35, 43]. Разница в частоте микроделетии локуса AZF Y-хромосомы в различных популяциях может быть связана с несколькими факторами, такими как генетический фон, Y-хромосомные гаплогруппы, критерии отбора пациентов, а также размер исследуемой выборки [44]. Ассоциации между генетическим фоном и микроделетии Y-хромосомы изучалась группой ученых под руководством Kihale P.E. при выявлении микроделетии Y-хромосомы в двух различных популяциях, японцев и африканцев [27]. Было обнаружено, что распространенность микроделетий в японской группе составила 6,2%, тогда как у африканцев микроделетии

Y-хромосомы не обнаружено. Таким образом, Y гаплогруппы является ключевым фактором в возникновении микроделений. Некоторые гаплогруппы (например, гаплогруппа E) более восприимчивы к делециям, а другие гаплогруппы могут обеспечивать защиту (например, гаплогруппа J) в отношении микроделений [46, 47]. Это связано с количеством, наличием/отсутствием и расположением некоторых элементов ДНК (например, элемент LPA4 в HERV15q2), необходимых для гомологичных внутривхромосомных рекомбинаций, приводящих к микроделениям.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В эпоху вспомогательных репродуктивных технологий, в частности, процедуры ЭКО/ИКСИ, исследование микроделений Y-хромосомы помогает открыть новые горизонты. Микроделения фактора азооспермии характерны при сперматогенных сбоях, которые могут привести к олигозооспермии или азооспермии. Выявление микроделений Y-хромосомы имеет диагностическое, прогностическое и профилактическое значение. Например, данная технология помогает врачам избежать эмпирических и часто дорогостоящих видов лечения бесплодия у мужчин, а также дает информацию о шансе нахождения сперматозоидов в семенниках мужчин с диагнозом азооспермия и о возможности криоконсервации спермы у пациентов с диагнозом олигозооспермия.

Финансирование

Работа выполнялась в рамках проекта «Разработка тест-системы для выявления микроделений локуса *AZF* Y-хромосомы» в рамках реализации государственного заказа по бюджетной программе «Промышленные биотехнологии».

ЛИТЕРАТУРА

1. Devroey P., Fauser B.C., Diedrich K. Evian Annual Reproduction (EVAR) Workshop Group 2008 Approaches to improve the diagnosis and management of infertility // *Hum Reprod Update*. – 2009. – Vol.15. – P. 391-408.
2. Boivin J., Bunting L., Collins J.A., Nygren K.G. International estimates of infertility prevalence and treatment-seeking: potential need and demand for infertility medical care // *Hum. Reprod.* – 2007. – Vol. 22. – P. 1506-1512.
3. Reynolds N., Cooke H.J. Role of the DAZ genes in male fertility // *Reprod Biomed Online*. – 2005. – Vol. 10. – P. 72-80.
4. Vogt P.H. Azoospermia factor (AZF) in Yq11: towards a molecular understanding of its function for human male fertility and spermatogenesis // *Reprod. Biomed. Online*. – 2005. – Vol. 10. – P. 81-93.
5. Wimmer R.L., Kirsch S., Weber A. et al. The Azoospermia region AZFa: an evolutionary view // *Cytogenet Genome Res.* – 2002. – Vol. 99. – P. 146-150.
6. Blanco P., Shlumukova M., Sargent C.A. et al. outcomes of intrachromosomal recombination on the human Y chromosome: male infertility and recurrent polymorphism // *Journal of Medical Genetics*. – 2000. – Vol. 37. – P. 752-758.
7. 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.
8. Blanco P., Shlumukova M., Sargent C.A. et al. Divergent outcomes of intrachromosomal recombination of the human Y chromosome: male infertility and recurrent polymorphism // *J. Med. Genet.* – 2000. – P. 752-758.
9. Brown G.M., Furlong R.A., Sargent C.A. et al. Characterisation of the coding sequence and fine mapping of the human DFFRY gene and comparative expression analysis and mapping to the Sxrb interval of the mouse Y chromosome of the DFFRY gene // *Hum Mol Genet.* – 1998. – Vol. 7. – P. 97-107.
10. Krausz C., Degl'Innocenti S., Nuti F. et al. Natural transmission of USP9Y gene mutations: a new perspective on the role of AZFa genes in male fertility // *Hum Mol Genet.* – 2006. – Vol. 15. – P. 2673-2681.
11. Elliott D.J. The role of potential splicing factors including RBMY, RBMX, hnRNP-G and STAR proteins in spermatogenesis // *Int J Androl.* – 2004. – Vol. 27. – P. 328-334.
12. Castle J.C., Zhang C., Shah J.K. et al. Expression of 24,426 human alternative splicing events and predicted cis regulation in 48 tissues and cell lines // *Nat Genet.* – 2008. – Vol. 40. – P. 1416-1425.
13. Vogt P.H., Affara N., Davey P. et al. Report of the Third International Workshop on Y Chromosome Mapping // *Cytogenet Cell Genet.* – 1997. – Vol. 79. – P. 1-20.
14. 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. – №5. – P. 933-943.
15. Carrell D.T., De Jonge C., Lamb D.J. The genetics of male infertility: a field of study whose time is now // *Arch Androl.* – 2006. – Vol. 52. – P. 269-274.
16. Zuffardi O., Tiepolo L. Localization of factors controlling spermatogenesis in the nonfluorescent portion of the human Y chromosome long arm // *Hum Genet.* – 1976. – Vol. 34. – P. 119-124.
17. Skaletsky H., Kuroda-Kawaguchi T., Minx P.J. et al. The male specific region of the human Y chromosome is a mosaic of discrete sequence classes // *Nature*. – 2003. – Vol. 423. – P. 825-837.
18. Vogt P.H. Azoospermia factor (AZF) in Yq11: towards a molecular understanding of its function for human male fertility and spermatogenesis // *Reprod. Biomed. Online*. – 2005. – Vol. 10. – P. 81-93.

19. Huleyuk N. et al. Complex cytogenetic and molecular-genetic analysis of males with spermatogenesis failure // *Tsitol. Genet.* – 2010. – Vol. 44. – P. 51-56.
20. Ferlin A. et al. Molecular and clinical characterization of Y chromosome microdeletions in infertile men: a 10-year experience in Italy // *J. Clin. Endocrinol. Metab.* – 2007. – Vol. 92. – P. 762-770.
21. Xiao-Wei Yu, Zhen-Tong Wei, Yu-Ting Jiang and Song-Ling Zhang. Y chromosome azoospermia factor region microdeletions and transmission characteristics in azoospermic and severe oligozoospermic patients // *Int J Clin Exp Med.* – 2015. – Vol. 8. – P. 14634-14646.
22. Park S.H. et al. Success rate of microsurgical multiple testicular sperm extraction and sperm presence in the ejaculate in Korean men with Y chromosome microdeletions // *Korean J. Urol.* – 2013. – Vol. 54. – P. 536-540.
23. Иконников М.В. и др. Медико-генетическое обследование супружеских пар, включенных в программы вспомогательных репродуктивных технологий // *Акушерство и гинекология.* – 2010. – №2. – С. 44-48.
24. Ceylan G.G., Ceylan C., Elyas H. Genetic anomalies in patients with severe oligozoospermia and azoospermia in eastern Turkey: a prospective study // *Genet. Mol. Res.* – 2009. – Vol. 8. – P. 915-922.
25. Mafra F.A. et al. Chromosomal and molecular abnormalities in a group of Brazilian infertile men with severe oligozoospermia or non-obstructive azoospermia attending an infertility service // *Int. Braz. J. Urol.* – 2011. – Vol. 37. – P. 244-250.
26. Choi D.K. et al. Detection of Y chromosome microdeletion is valuable in the treatment of patients with nonobstructive azoospermia and oligoasthenoteratozoospermia: sperm retrieval rate and birth rate // *Korean J. Urol.* – 2013. – Vol. 54. – P. 111-116.
27. Kihale P.E., Yasui A., Shuto Y. Prospective assessment of Y-chromosome microdeletions and reproductive outcomes among infertile couples of Japanese and African origin // *J. Exp. Clin. Assist. Reprod.* – 2005. – Vol. 29. – P. 2-9.
28. Miller S.A., Dykes D., Polesky H.F. A simple salting-out procedure for extracting DNA from human nucleated cells // *Nucleic Acids Res.* – 1988. – Vol. 16. – P. 1215.
29. Krausz C. et al. EAA/EMQN best practice guidelines for molecular diagnosis of Y-chromosomal microdeletions: state-of-the-art 2013 // *Andrology.* – 2014. – Vol. 2. – P. 5-19.
30. Balkan M., Tekes S., Gedik A. Cytogenetic and Y chromosome microdeletion screening studies in infertile males with Oligozoospermia and Azoospermia in Southeast Turkey // *J Assist Reprod Genet.* – 2008. – Vol. 25. – P. 559-565.
31. Li D., Zhang H., Wang R., Zhu H., Li L. and Liu R. Chromosomal abnormalities in men with pregestational and gestational infertility in north-east China // *J Assist Reprod Genet.* – 2012. – Vol. 29. – P. 829-836.
32. Mitra A., Dada R., Kumar R. et al. Screening for Y-chromosome microdeletions in infertile Indian males: utility of simplified multiplex PCR // *Indian J Med Res.* – 2008. – Vol. 127. – P. 124-132.
33. Nakashima M., Koh E., Namiki M. and Yoshida A. Multiplex sequence-tagged site PCR for efficient screening of microdeletions in Y chromosome in infertile males with azoospermia or severe oligozoospermia // *Arch Androl.* – 2002. – Vol. 48. – P. 351-358.
34. Rejeb I., M'Rad R., Maazoul F. et al. Y chromosome microdeletions in Tunisian infertile males // *Pathol Biol (Paris).* – 2008. – Vol. 56. – P. 111-115.
35. Chellat D., Rezgoune M.L., McElreavey K. et al. First study of microdeletions in the Y chromosome of Algerian infertile men with idiopathic oligo- or azoospermia // *Urol Int.* – 2013. – Vol. 90. – P. 455-459.
36. Pina-Neto J.M., Carrara R.C., Bisinella R. et al. Somatic cytogenetic and azoospermia factor gene microdeletion studies in infertile men // *Braz J Med Biol Res.* – 2006. – Vol. 39. – P. 555-561.
37. Stahl P.J., Masson P., Mielnik A. et al. A decade of experience emphasizes that testing for Y microdeletions is essential in American men with azoospermia and severe oligozoospermia // *Fertil Steril.* – 2010. – Vol. 94. – P. 1753-1756.
38. Martinez C., Mar C., Azcarate M. et al. Sperm motility index: a quick screening parameter from sperm quality analyser-IIB to rule out oligo- and asthenozoospermia in male fertility study // *Hum Reprod.* – 2000. – Vol. 15. – P. 1727-1733.
39. Shi Y.C., Cui Y.X., Wei L. et al. AZF microdeletions on the Y chromosome in infertile Chinese men: a five-year retrospective analysis // *Zhonghua Nan Ke Xue.* – 2010. – Vol. 16. – P. 9.
40. Brandell R.A., Mielnik A., Liotta D. et al. AZFb deletions predict the absence of spermatozoa with testicular sperm extraction: preliminary report of a prognostic genetic test // *Hum Reprod.* – 1998. – Vol. 13. – P. 2812-2815.
41. Dohle G.R., Halley D.J., Van Hemel J.O. et al. Genetic risk factors in infertile men with severe oligozoospermia and azoospermia // *Hum Reprod.* – 2002. – Vol. 17. – P. 13-16.
42. Zhang Y.S., Dai R.L., Wang R.X. et al. Analysis of Y chromosome microdeletion in 1738 infertile men from northeastern China // *Urology.* – 2013. – Vol. 82. – P. 584-588.
43. Behulova R., Varga I., Strhakova L. et al. Incidence of microdeletions in the AZF region of the Y chromosome in Slovak patients with azoospermia // *Biomed Pap Med Fac Univ Palacky Olomouc Czech Repub.* – 2011. – Vol. 155. – P. 33-38.
44. Ashraf J. Shaqalaih, Masood S. Abu Halima, Mohammed J. Ashour, and Fadel A. Sharif. Screening for Y Chromosome Microdeletions in a Population of Infertile Males in the Gaza Strip. // *J Exp Clin Assist Reprod.* – 2009. – Vol. 6. – P. 7-11.
45. Arredi B., Ferlin A., Speltra E. et al. Y-Chromosome Haplogroups and Susceptibility to Azoospermia Factor C Microdeletion in an Italian Population // *J Med Genet.* – 2007. – Vol. 44. – P. 205-208.

46. Yang Y., Ma M., Li L. et al. Y Chromosome Haplogroups May Confer Susceptibility to Partial AZFc Deletions and Deletion Effect on Spermatogenesis Impairment // *Hum Reprod.* – 2008. – Vol. 23. – P. 2167-2172.

REFERENCES

1. Devroey P., Fauser B.C., Diedrich K. Evian Annual Reproduction (EVAR) Workshop Group 2008 Approaches to improve the diagnosis and management of infertility. *Hum Reprod Update*, 2009, vol. 15, pp. 391-408.
2. Boivin J., Bunting L., Collins J.A., Nygren K.G. International estimates of infertility prevalence and treatment-seeking: potential need and demand for infertility medical care. *Hum. Reprod.*, 2007, vol. 22, pp. 1506-1512.
3. Reynolds N., Cooke H.J. Role of the DAZ genes in male fertility. *Reprod Biomed Online*, 2005, vol. 10, pp. 72-80.
4. Vogt P.H. Azoospermia factor (AZF) in Yq11: towards a molecular understanding of its function for human male fertility and spermatogenesis. *Reprod. Biomed. Online*, 2005, vol. 10, pp. 81-93.
5. Wimmer R.I., Kirsch S., Weber A. et al. The Azoospermia region AZFa: an evolutionary view. *Cytogenet Genome Res.*, 2002, vol. 99, pp. 146-150.
6. Blanco P., Shlumukova M., Sargent C.A. et al. Divergent outcomes of intrachromosomal recombination on the human Y chromosome: male infertility and recurrent polymorphism. *Journal of Medical Genetics.*, 2000, vol. 37, pp. 752-758.
7. 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, pp. 119-124.
8. Blanco P., Shlumukova M., Sargent C.A. et al. Divergent outcomes of intrachromosomal recombination of the human Y chromosome: male infertility and recurrent polymorphism. *J. Med. Genet.*, 2000, pp. 752-758.
9. Brown G.M., Furlong R.A., Sargent C.A. et al. Characterisation of the coding sequence and fine mapping of the human DFFRY gene and comparative expression analysis and mapping to the Sxrb interval of the mouse Y chromosome of the Dffry gene. *Hum Mol Genet.*, 1998, vol. 7, pp. 97-107.
10. Krausz C., Degl'Innocenti S., Nuti F. et al. Natural transmission of USP9Y gene mutations: a new perspective on the role of AZFa genes in male fertility. *Hum Mol Genet.*, 2006, vol. 15, pp. 2673-2681.
11. Elliott D.J. The role of potential splicing factors including RBMY, RBMX, hnRNPG-T and STAR proteins in spermatogenesis. *Int J Androl.*, 2004, vol. 27, pp. 328-334.
12. Castle J.C., Zhang C., Shah J.K. et al. Expression of 24,426 human alternative splicing events and predicted cis regulation in 48 tissues and cell lines. *Nat Genet.*, 2008, vol. 40, pp. 1416-1425.
13. Vogt P.H., Affara N., Davey P. et al. Report of the Third International Workshop on Y Chromosome Mapping. *Cytogenet Cell Genet.*, 1997, vol. 79, pp. 1-20.
14. Vogt P.H., Edlmann A., Kirsch S. et al. Human Y chromosome azoospermia factors (AZF) mapped to different subregions in Yq11. *Hum Mol Genet.*, 1996, no. 5, pp. 933-943.
15. Carrell D.T., De Jonge C., Lamb D.J. The genetics of male infertility: a field of study whose time is now. *Arch Androl.*, 2006, vol. 52, pp. 269-274.
16. Zuffardi O., Tiepolo L. Localization of factors controlling spermatogenesis in the nonfluorescent portion of the human Y chromosome long arm. *Hum Genet.*, 1976, vol. 34, pp. 119-24.
17. Skaletsky H., Kuroda-Kawaguchi T., Minx P.J. et al. The male specific region of the human Y chromosome is a mosaic of discrete sequence classes. *Nature*, 2003, vol. 423, pp. 825-837.
18. Vogt P.H. Azoospermia factor (AZF) in Yq11: towards a molecular understanding of its function for human male fertility and spermatogenesis. *Reprod. Biomed. Online*, 2005, vol. 10, pp. 81-93.
19. Huleyuk N. et al. Complex cytogenetic and molecular-genetic analysis of males with spermatogenesis failure. *Tsitol. Genet.*, 2010, vol. 44, pp. 51-56.
20. Ferlin A. et al. Molecular and clinical characterization of Y chromosome microdeletions in infertile men: a 10-year experience in Italy. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 2007, vol. 92, no. 3, pp. 762-770.
21. Xiao-Wei Yu, Zhen-Tong Wei, Yu-Ting Jiang and Song-Ling Zhang. Y chromosome azoospermia factor region microdeletions and transmission characteristics in azoospermic and severe oligozoospermic patients. *Int J Clin Exp Med.*, 2015, vol. 8, pp. 14634-14646.
22. Park S.H. et al. Success rate of microsurgical multiple testicular sperm extraction and sperm presence in the ejaculate in Korean men with Y chromosome microdeletions. *Korean J. Urol.*, 2013, vol. 54, no. 8, pp. 536-540.
23. Icpnnicov M.V. et al. Medico-geneticheskoe obsledovanie supruzheskih par, vkluchenih v program vspomogatel'nykh reproductivnykh tehnologij [Medical and genetic examination of married couples, included in the program of assisted reproductive technologies]. *Ocucherstvo i gynecologia - Obstetrics and Gynecology*, 2010, no. 2, pp. 44-48.
24. Ceylan G.G., Ceylan C., Elyas H. Genetic anomalies in patients with severe oligozoospermia and azoospermia in eastern Turkey: a prospective study. *Genet. Mol. Res.*, 2009, vol. 8, no. 3, pp. 915-922.
25. Mafra F.A. et al. Chromosomal and molecular abnormalities in a group of Brazilian infertile men with severe oligozoospermia or non-obstructive azoospermia attending an infertility service. *Int. Braz. J. Urol.*, 2011, vol. 37, no. 2, pp. 244-250.
26. Choi D.K. et al. Detection of Y chromosome microdeletion is valuable in the treatment of patients with nonobstructive azoospermia and oligoasthenoteratozoospermia: sperm retrieval rate and birth rate. *Korean J. Urol.*, 2013, vol. 54, no. 2, pp. 111-116.

27. Kihale P.E., Yasui A., Shuto Kihale Y. Prospective assessment of Y-chromosome microdeletions and reproductive outcomes among infertile couples of Japanese and African origin. *J. Exp. Clin. Assist. Reprod.*, 2005, vol. 29, pp. 2-9.
28. Miller S.A., Dykes D., Polesky H.F. A simple salting-out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucleic Acids Res.*, 1988, vol. 16, pp. 1215.
29. Krausz C. et al. EAA/EMQN best practice guidelines for molecular diagnosis of Y-chromosomal microdeletions: state-of-the-art 2013. *Andrology*, 2014, vol. 2, pp. 5-19.
30. Balkan M., Tekes S. and Gedik A. Cytogenetic and Y chromosome microdeletion screening studies in infertile males with Oligozoospermia and Azoospermia in Southeast Turkey. *J Assist Reprod Genet.*, 2008, vol. 25, pp. 559-565.
31. Li D., Zhang H., Wang R. et al. Chromosomal abnormalities in men with pregestational and gestational infertility in northeast China. *J Assist Reprod Genet.*, 2012, vol. 29, pp. 829-836.
32. Mitra A., Dada R., Kumar R. et al. Screening for Y-chromosome microdeletions in infertile Indian males: utility of simplified multiplex PCR. *Indian J Med Res.*, 2008, vol. 127, pp. 124-132.
33. Nakashima M., Koh E., Namiki M. and Yoshida A. Multiplex sequence-tagged site PCR for efficient screening of microdeletions in Y chromosome in infertile males with azoospermia or severe oligozoospermia. *Arch Androl.*, 2002, vol. 48, pp. 351-358.
34. Rejeb I., M'Rad R., Maazoul F. et al. Y chromosome microdeletions in Tunisian infertile males. *Pathol Biol (Paris)*, 2008, vol. 56, pp. 111-115.
35. Chellat D., Rezgoune M.L., McElreavey K. et al. First study of microdeletions in the Y chromosome of Algerian infertile men with idiopathic oligo- or azoospermia. *Urol Int.*, 2013, vol. 90, pp. 455-459.
36. Pina-Neto J.M., Carrara R.C., Bisinella R. et al. Somatic cytogenetic and azoospermia factor gene microdeletion studies in infertile men. *Braz J Med Biol Res.*, 2006, vol. 39, pp. 555-561.
37. Stahl P.J., Masson P., Mielnik A. et al. A decade of experience emphasizes that testing for Y microdeletions is essential in American men with azoospermia and severe oligozoospermia. *Fertil Steril*, 2010, vol. 94, pp. 1753-1756.
38. Martinez C., Mar C., Azcarate M. et al. Sperm motility index: a quick screening parameter from sperm quality analyser-IIB to rule out oligo- and asthenozoospermia in male fertility study. *Hum Reprod*, 2000, vol. 15, pp. 1727-1733.
39. Shi Y.C., Cui Y.X., Wei L. et al. AZF microdeletions on the Y chromosome in infertile Chinese men: a five-year retrospective analysis. *Zhonghua Nan Ke Xue*, 2010, vol. 16, pp. 9.
40. Brandell R.A., Mielnik A., Liotta D. et al. AZFb deletions predict the absence of spermatozoa with testicular sperm extraction: preliminary report of a prognostic genetic test. *Hum Reprod*, 1998, vol. 13, pp. 2812- 2815.
41. Dohle G.R., Halley D.J., Van Hemel J.O. et al. Genetic risk factors in infertile men with severe oligozoospermia and azoospermia. *Hum Reprod*, 2002, vol. 17, pp. 13-16.
42. Zhang Y.S., Dai R.L., Wang R.X. et al. Analysis of Y chromosome microdeletion in 1738 infertile men from northeastern China. *Urology*, 2013, vol. 82, pp. 584-588.
43. Behulova R., Varga I., Strhakova L. et al. Incidence of microdeletions in the AZF region of the Y chromosome in Slovak patients with azoospermia. *Biomed Pap Med Fac Univ Palacky Olomouc Czech Repub.*, 2011, vol. 155, pp. 33-38.
44. Ashraf J. Shaqalaih, Masood S. Abu Halima, Mohammed J. Ashour, and Fadel A. Sharif. Screening for Y Chromosome Microdeletions in a Population of Infertile Males in the Gaza Strip. *J Exp Clin Assist Reprod.*, 2009, vol. 6, pp. 7-11.
45. Arredi B., Ferlin A., Speltra E. et al. Y-Chromosome Haplogroups and Susceptibility to Azoospermia Factor C Microdeletion in an Italian Population. *J Med Genet.*, 2007, vol. 44, pp. 205-208.
46. Yang Y., Ma M., Li L. et al. Y Chromosome Haplogroups May Confer Susceptibility to Partial AZFc Deletions and Deletion Effect on Spermatogenesis Impairment. *Hum Reprod*, 2008, vol. 23, pp. 2167-2172.

Ү - ХРОМОСОМЫНЫҢ AZF ЛОКУСЫНДАҒЫ МИКРОДЕЛЕЦИЯНЫ МОЛЕКУЛЯРЛЫ-ГЕНЕТИКАЛЫҚ ТАЛДАУ

**Қайыржанова А.Д.,¹ Камалова Д.К.,¹ Әбішева Г.Д.,¹ Әмірғазин А.О.,¹ Шведюк В.Б.,
¹ Попова О.А.,² Ким Г.М.,² Шевцов А.Б.¹**

¹ Ұлттық биотехнология орталығы

Қорғалжын тас жолы, 13/5, Астана, 010000, Қазақстан

² «Астана ЭКОЛАЙФ» ЖШС

Алаш тас жолы, 22, Астана, 010000, Қазақстан

apple_sk@mail.ru

ТҮЙІН

Еркек бедеулігі репродуктологияда маңызды роль атқарады. Дегенмен, шәует шығару және белсіздіктің бұзылуы медициналық терапияда сәтті емделуі мүмкін, генетикалық тұрғыдан туындаған

көптеген бұзылуларды жеңу мүмкін емес. Y-хромосомының микроделециясы еркек бедеулігінің кеңінен тараған генетикалық себебі болып табылады. Y-хромосомының ұзын иығының дистальді ұшында азооспермия факторының (AZF) локусы болады, онда сперматогенезге қажетті гендер орналасқан. Y-хромосомының ұзын иығындағы микроделециялар сперматогенездің бұзылуымен байланысты, сонымен қатар, 5-10 % және 10-15 % жағдайға сәйкес олигозооспермия мен азооспермияның жиі болатын генетикалық себебі болып табылады. Біздің зерттеуіміз бойынша AZF локусындағы микроделецияны табу үшін генетикалық маркер ретінде Еуропалық андрологтар бірлестігі ұсынған 6 STS маркерлері және Y хромосомының бар болуын анықтайтын, реакцияның ингибирленуін бақылауға арналған 2 бақылаушы ген таңдап алынды. Ұсынылатын нәтиже, құрастырылған тест-жүйені қолдану арқылы тестілеу нәтижесінде алынған еркектердің 138 ДНҚ үлгісі. Қазақстанның популяциялық таңдамасындағы Y хромосомының AZF локусы микроделециясының таралу нәтижесі сипатталды. Олигозооспермиясы бар еркектерде AZF локусының делециясы 11% жағдайында анықталды. Жалпы саны 45 адамды құрайтын, азооспермиясы бар еркектер тобында AZF субауданында делециялар жеті еркекте анықталды (16% жағдайда).

Негізгі сөздер: Y-хромосома, AZF локус, STS маркерлер, ПТР, еркек бедеулігі, микроделеция.