

КЛИНИЧЕСКИЕ МОЛЕКУЛЯРНЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2018

УДК 616.697-092:612.6.05:577.21.083

Аксельрод Э.В.¹, Миронов К.О.¹, Михайленко Д.С.^{2,3}, Ефремов Г.Д.³, Перепечин Д.В.³, Алексеев Б.Я.³, Потехина Е.С.¹, Шипулин Г.А.¹

РАЗРАБОТКА И АПРОБАЦИЯ МЕТОДИКИ НА ОСНОВЕ МУЛЬТИПЛЕКСНОЙ ПОЛИМЕРАЗНОЙ ЦЕПНОЙ РЕАКЦИИ В РЕЖИМЕ РЕАЛЬНОГО ВРЕМЕНИ ДЛЯ ОПРЕДЕЛЕНИЯ КЛИНИЧЕСКИ ЗНАЧИМЫХ МИКРОДЕЛЕЦИЙ В Y-ХРОМОСОМЕ

¹ФБУН Центральный НИИ эпидемиологии Роспотребнадзора, 111123, Москва, Россия;

²НИИ молекулярной медицины ФГБОУ ВО «Первый МГМУ им. И.М. Сеченова» Минздрава России, 119991, Москва, Россия;

³НИИ урологии и интервенционной радиологии им. Н.А. Лопаткина – филиал ФГБУ «НМИРЦ» Минздрава РФ, 105425, Москва, Россия

Одна из распространённых генетических причин идиопатического мужского бесплодия связана с микроделециями в локусе AZF, расположенном в Y-хромосоме. Частота таких микроделетий в общей популяции составляет 1:4000, однако у инфертильных мужчин их частота варьирует от 2 до 10%. В локусе AZF различают три субрегиона: AZFa, AZFb и AZFc. Потеря одного или нескольких субрегионов может приводить к различной степени нарушения сперматогенеза – от снижения его активности до Сертולי-клеточного синдрома, выраженного азооспермией или олигоспермией тяжёлой степени. Поэтому проведение генетического тестирования на наличие микроделетий в локусе AZF является необходимым тестом при прогнозировании мужского бесплодия и его лечения. Цель настоящего исследования – разработать и апробировать диагностическую систему для выявления микроделетий в субрегионах локуса AZF с помощью мультиплексной полимеразной цепной реакции (ПЦР) в режиме реального времени. В качестве референсного метода использовали методику, описанную в рекомендациях, выпущенных Европейской академией андрологии (European Academy of Andrology, EAA) совместно с Европейской сетью качества молекулярно-генетических исследований (European Molecular Genetics Quality Network, EMQN) (Krausz C. и соавт., 2014). При апробации методики было проанализировано 33 образца ДНК, выделенных из крови мужчин с азооспермией и олигоспермией тяжёлой степени. В сравнении с референсной методикой дискордантных результатов получено не было. В 27 образцах ДНК выявлены делеции в локусе AZF: 4 делеции AZFa (15%), 2 делеции AZFb (7%), 17 делеций AZFc (63%) и 6 сочетанных делеций AZFb+c и AZFa+b+c (22%). Предлагаемая методика позволяет выявлять микроделетии субрегионов локуса AZF.

Ключевые слова: мужское бесплодие; микроделетии AZF локуса; субрегион AZFa; субрегион AZFb; субрегион AZFc; ИКСИ; ПЦР в режиме реального времени.

Для цитирования: Аксельрод Э.В., Миронов К.О., Михайленко Д.С., Ефремов Г.Д., Перепечин Д.В., Алексеев Б.Я., Потехина Е.С., Шипулин Г.А. Разработка и апробация методики на основе мультиплексной полимеразной цепной реакции в режиме реального времени для определения клинически значимых микроделетий в Y-хромосоме. Клиническая лабораторная диагностика. 2018; 63 (2): 124-128. DOI: <http://dx.doi.org/10.18821/0869-2084-2018-63-2-124-128>

Akselrod E.V.¹, Mironov K.O.¹, Mikhailenko D.S.^{2,3}, Efremov G.D.³, Perepechin D.V.³, Alekseev B.Ya.³, Potekhina E.S.¹, Shipulin G.A.¹

THE DEVELOPMENT AND APPROBATION OF METHODOLOGY ON THE BASIS OF MULTIPLEX POLYMERASE CHAIN REACTION IN REAL-TIME TO DETERMINE CLINICALLY SIGNIFICANT MICRO-DELETION IN Y-CHROMOSOME

¹The Federal Budget Institution of Science "The Central Research Institute of Epidemiology" of Rosпотребнадзор, 111123, Moscow, Russia

²The Federal State Autonomous Educational Institution of Higher Education "The I.M. Sechenov First Moscow State Medical University" of Minzdrav of Russia, 119991, Moscow, Russia

³The N.A. Lopatkin research institute of urology and intervention radiology - the Branch of The Federal State Budget Scientific Institution "The National Medical Research Center" of Minzdrav of Russia, 105425, Moscow, Russia

One of the prevalent genetic causes of idiopathic male sterility is related to micro-deletions in AZF locus located in Y-chromosome. In total population, rate of such micro-deletions makes up to 1:4000. however, in infertile males their rate varies from 2% to 10%. In AZF locus three subregions are distinguished: AZFa, AZFb and AZFc. The loss of one or several subregions can result in disorder of spermatogenesis of various degree - from decreasing of its activity to Sertoli-cell syndrome manifested by azoospermia or oligospermia of severe degree. Therefore, implementation of genetic testing for presence of micro-deletions in AZF locus is a necessary test in case of prognosis of male sterility and its treatment. The purpose of study is to develop and

test a diagnostic system of detection of micro-deletions in subregions of AZF locus using multiplex polymerase chain reaction in real-time. As a reference method a technique was implemented described in guidelines of the European Academy of Andrology conjointly with European Molecular Genetics Quality Network. The technique testing specified analysis of 33 samples of DNA separated from blood of males with azoospermia and oligospermia of severe degree. No discordant results were received as compared with reference method. In 27 DNA samples the deletions were detected in AZF locus: 4 AZFa deletions (15%), 2 AZFb deletions (7%), 17 AZFc deletions (63%) and 6 combined deletions of AZFb+c and AZFa+b+c (22%). The proposed technique permits detect micro-deletions of subregions of AZF locus.

Key words: male sterility; micro-deletions; AZF locus; subregion AZFa; subregion AZFb; subregion AZFc; polymerase chain reaction in real-time

For citation: Aksele E.V., Mironov K.O., Mikhailenko D.S., Efremov G.D., Perepechin D.V., Alekseev B.Ya., Potekhina E.S., Shipulin G.A. The development and approbation of methodology on the basis of multiplex polymerase chain reaction in real-time to determine clinically significant micro-deletion in Y-chromosome. *Klinicheskaya Laboratornaya Diagnostika (Russian Clinical Laboratory Diagnostics)* 2018; 63(2): 124-128 (in Russ.). DOI: <http://dx.doi.org/10.18821/0869-2084-2018-63-2-124-128>

For correspondence: Aksele E.V., researcher of the scientific group of development of new methods of detection of genetic polymorphisms of the Federal Budget Institution of Science "The Central Research Institute of Epidemiology", e-mail: sil-elia@rambler.ru

Conflict of interests. The authors declare absence of conflict of interests.

Acknowledgment. The study had no sponsor support.

Received 13.09.2017
Accepted 17.11.2017

Введение. Среди основных причин идиопатического мужского бесплодия важную роль играют различные генетические отклонения: хромосомные аномалии, микроструктурные перестройки, генные мутации [1, 2]. Наиболее значимыми являются генетические нарушения в Y-хромосоме [3–6]. К одним из таких нарушений относят микроделеции, располагающиеся в локусе AZF (Azoospermia Factor, фактор азооспермии) на длинном плече Y-хромосомы, содержащем гены, контролирующие сперматогенез [7]. В локусе AZF различают три субрегиона: AZFa, AZFb и AZFc [8, 9]. Микроделеции в локусе AZF встречаются в среднем у одного из 4000 мужчин в общей популяции, а у инфертильных мужчин их частота варьирует от 2 до 10%. Они не обнаруживаются у мужчин с нормозооспермией, но их частота повышена у мужчин с азооспермией (8–12%) и олигозооспермией (3–7%) при концентрации спермы менее 5 млн/мл [10, 11].

У бесплодных мужчин наиболее распространены микроделеции в субрегионе AZFc (65–70%), реже – в субрегионах AZFb, AZFb+c, AZFa+b+c (28–30%) и очень редко в субрегионе AZFa (5%) [12]. Потеря всего субрегиона AZFa фенотипически выражается Сертоли-клеточным синдромом (отсутствием половых клеток во всех или части семенных канальцев) и азооспермией, поэтому выделение сперматозоидов из ткани яичка для проведения интрацитоплазматической инъекции сперматозоида (ИКСИ) невозможно. Потеря всего субрегиона AZFb или AZFb+c приводит к Сертоли-клеточному синдрому или блоку сперматогенеза, выраженному азооспермией. В этом случае вероятность получить сперматозоиды из тканей яичка для ИКСИ незначительна и близка к нулю. Потеря всего субрегиона AZFc выражается в широком спектре возможных нарушений сперматогенеза от азооспермии до олигозооспермии и в 50% случаев позволяет получить сперматозоиды из ткани яичка для проведения ИКСИ [13].

Таким образом, проведение генетического тестирования на наличие микроделеций в локусе AZF Y-хромосомы является необходимым как при прогнозировании мужского бесплодия и его лечения, так и при планировании проведения ИКСИ [14, 15].

В 2014 г. были опубликованы рекомендации по

молекулярно-биологической диагностике нарушений сперматогенеза, выпущенные под эгидой Европейской академии андрологии (European Academy of Andrology, EAA) и Европейской сетью качества молекулярно-генетических исследований (European Molecular Genetics Quality Network, EMQN) [16], которые включали базовый и расширенный алгоритмы обследования бесплодных мужчин. Базовый алгоритм содержит 6 основных STS-маркеров: по 2 маркера на каждый субрегион локуса AZF, а расширенный алгоритм, который используют в случае обнаружения микроделеций в локусе AZF базовым методом, содержит дополнительные 13 STS-маркеров, с помощью которых возможно установить точные границы и длины делетированных областей субрегионов локуса AZF, имеющих важное клиническое значение.

В связи с этим цель работы заключалась в разработке и апробации диагностической системы для выявления микроделеций в субрегионах локуса AZF с помощью мультиплексной ПЦР в режиме реального времени с учётом последних рекомендаций EAA/EMQN.

Материал и методы. Клинические образцы. При апробации методики использовано 33 образца ДНК, выделенных из крови мужчин с азооспермией и олигозооспермией тяжелой степени; образцы предоставлены отделом патологической анатомии с группой молекулярной генетики НИИ урологии и интервенционной радиологии им. Н.А. Лопаткина – филиала ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский радиологический центр» Минздрава России. Выделение геномной ДНК из цельной крови проводили с помощью набора «Wizard® Genomic DNA Purification Kit» («Promega», США). Клинические образцы были предварительно проанализированы по 12 STS-маркерам (sY83, sY84, sY86, sY127, sY134, sY143, sY152, sY157, sY254, sY255, SRY, AMELX/Y) методом мультиплексной ПЦР в четырех комбинациях анализируемых локусов с последующим разделением продуктов амплификации в полиакриламидном геле. В основе методики – амплификация с праймерами, последовательности которых были опубликованы ранее [17–22].

ПЦР в режиме реального времени. Для определения микроделеций использовали две пентаплексные

Таблица 1

Результаты анализа 33 образцов ДНК на наличие микроделеций в локусе AZF

Субрегион локуса AZF						Количество образцов
AZFa		AZFb		AZFc		
Sy84	sY86	sY127	sY134	sY254	sY255	
+	+	-	-	-	-	2
+	+	+	+	-	-	17
-	-	+	+	+	+	4
+	+	-	-	+	+	2
+	+	+	+	+	+	6
-	-	-	-	-	-	2

Примечание. «+» - делеция не найдена, «-» - делеция найдена.

ПЦР-смеси с праймерами и зондами для локусов sY84, sY134, sY255 (ПЦР-смесь 1) и sY86, sY127, sY254 (ПЦР-смесь 2). Каждая ПЦР-смесь содержала праймеры и зонды для амплификации фрагментов генов SR Y (ген Y-хромосомы, определяющий пол) и ZFX/Y (ген «цинковых пальцев», присутствующий на хромосомах Y и X), которые являются внутренними контролями и

позволяют определить соответствие фенотипического пола генетическому.

Амплификацию фрагментов локуса AZF, содержащих субрегионы AZFa, AZFb и AZFc, проводили с помощью приборов «Rotor-Gene Q» («Qiagen», Германия) и «Rotor-gene 6000» («Corbett Research», Австралия) по следующей программе: 95°C – 15 мин, далее 45 циклов: 95°C – 10 с и 60°C – 20 с. ПЦР проводили в объёме 25 мкл, состав реакционной смеси содержал смесь 0,44 мМ дезоксинуклеозидтрифосфатов, 0,28 мкМ праймеров, 0,08 мкМ зондов, реагенты «Полимераза Taq-F» – 0,5 мкл, «ОТ-ПЦР-смесь 2-FER/FRT» – 4,5 мкл и выделенная ДНК – 10 мкл в количестве 10 нг. В качестве положительного образца был использован образец ДНК мужчины, не содержащий делеции, а в качестве отрицательного – образец ДНК женщины.

Учёт результатов проводился по пяти каналам флуоресценции: по каналу Green детектировалось наличие или отсутствие делеций в субрегионе AZFa (маркеры sY84, sY86), Yellow – делеции в субрегионе AZFb (sY127 и sY134), Orange – делеции в субрегионе AZFc (sY254 и sY255), по каналам Red и Crimson проводилась детекция контрольных фрагментов амплификации локусов SR Y и

Таблица 2

Последовательности праймеров и зондов для ПЦР-смесей 1 и 2

Локус	Последовательности олигонуклеотидов (5'-3')*	п.о. ***
sY84 (AZFa)	gCACgAAACATgggCTggAgATT gCCTACTACCTggAggCTTC** (FAM)gggACCCT(BHQ1)TTCTTTAgTgTCTgCCTAATgC(P)	117
sY134 (AZFb)	ggTTTCATGATCATATCCTCTTTCAgTCAC CTTTTAgAggAATAgTACAaggTCAAaggAA (R6G)ggggTg+AT(BHQ1)+ACT+AA+AgT+TT+AAA+ACATCTgg(P)	122
sY255 (AZFc)	gTTACAaggATTCggCgTgAT** CTCgTCATgTgCAgCCAC** (ROX)CCgCCAAGAgCTTCTgAAACTgTggTgg(BHQ2)	114
sY86(AZFa)	CACTTTgCAggACAgAgACTTggTA CTAgCCTCAAaggACTgTgAgAATCAA (FAM)ggggCCCAGT(BHQ1)CTTTgggATTCTTTgTAACAACCTC(P)	110
sY127 (AZFb)	ggCTCACAAACgAAAAgAAA gTgACACAgAAATgCCTTTgTCTT (R6G)gCCCAGTgTT(BHQ1)CATgCCCACAAAAAgAg(P)	134
sY254 (AZFc)	gggTgTTACCAgAAggCAAA** gCAATTCTAAACCTCCAaggAAgTAC (ROX)CAgggCCCACAT(BHQ2)CCCATTgTTCATgATgT(P)	117
SR Y	gCAGTTTgCTTCCCgCAGAT gCTggTgCTCCATTCTTgAg** (Cy5)CCCgCTTCggTACTCTgCAGCgAAgTgC(BHQ2)	114
ZFX/Y	ACCrCTgTACTgACTgTgATTACAC CTCATCrCATCAATggCCTTCT** (Cy5.5)CCACCTggAgAgCCACAAGCTgACCAgC(BHQ2)	110

Примечание. * - перед конформационно-блокированным нуклеотидом стоит знак +; ** – праймеры, взятые из рекомендаций EAA/EMQN [16]; *** – количество пар нуклеотидных оснований (п.о.) амплифицируемого фрагмента.

ZFX/Y соответственно. При накоплении сигнала флуоресценции по каналам Green, Yellow и Orange результат интерпретировался как отрицательный (отсутствие микроделений в субрегионах AZF локуса); при положительных сигналах флуоресценции по каналам Red и Crimson и отсутствие сигнала накопления флуоресценции по каналам Green, Yellow или Orange интерпретировалось как наличие микроделений в субрегионах AZF локуса.

Метод сравнения. В качестве метода сравнения использована методика, рекомендованная EAA/EMQN [16], со следующими изменениями: объём ПЦР-смеси составил 25 мкл, амплификация фрагментов проводилась на приборе «Терцик» («ДНК-технология», Россия), продукты разделялись в 1,7% агарозном геле.

Результаты. Разработана методика на основе ПЦР в режиме реального времени, позволяющая выявлять микроделения субрегионов AZFa, AZFb и AZFc локуса AZF. Проанализировано по два локуса из каждого субрегиона: sY84 и sY86 (субрегион AZFa), sY127 и sY134 (субрегион AZFb) и sY254 и sY255 (субрегион AZFc).

На первом этапе проведена апробация разработанной методики на образцах ДНК, полученных от мужчин, у которых отсутствовали микроделения в локусе AZF (положительный контроль) и от женщин (отрицательный контроль). В результате для образцов ДНК, полученных от мужчин, наблюдалось накопление флуоресценции по всем пяти каналам детекции, что свидетельствовало об отсутствии микроделений в локусе AZF. В образцах ДНК, полученных от женщин, накопление флуоресценции наблюдалось только по каналу Crimson, по которому определялась мишень ZFX/Y.

На втором этапе было исследовано 33 образца ДНК, полученных от мужчин с азооспермией и олигозооспермией тяжелой степени. Деления локуса AZF были подтверждены в 27 образцах. Образцы были проанализированы параллельно с помощью двух ПЦР-методик, discordантных результатов получено не было. В четырех образцах были найдены делеции субрегиона AZFa, в двух образцах – субрегиона AZFb, в 17 образцах – субрегиона AZFc. В двух образцах были найдены делеции субрегионов AZFb и AZFc (AZFb+c) и в двух других образцах – трёх субрегионов (AZFa+b+c). В остальных шести образцах ДНК ни в одном из субрегионов локуса AZF микроделений найдено не было. Результаты анализа локуса AZF представлены в табл. 1.

Обсуждение. Согласно существующим рекомендациям EAA/EMQN по молекулярно-биологической диагностике нарушений сперматогенеза [16], базовый алгоритм обследования бесплодных мужчин включает анализ шести STS-маркёров: sY84 и sY86 для субрегиона AZFa, sY127 и sY134 для субрегиона AZFb и sY254 и sY255 для субрегиона AZFc. Расширенный анализ, который рекомендован в случае обнаружения микроделений в ходе базового анализа, включает исследование дополнительных маркёров для каждого субрегиона: sY82, sY83/sY1064, sY1065/sY1182, sY88 – для субрегиона AZFa, sY105, sY121/sY1224, sY143/sY1192, sY153 – для субрегиона AZFb и sY160 – для субрегиона AZFc.

По данным EAA/EMQN более 95% известных микроделений локуса AZF хромосомы Y могут быть определены при детекции STS-маркёров sY84 и sY86 (субрегион AZFa), sY127 и sY134 (субрегион AZFb) и sY254 и sY255 (субрегион AZFc) [16], поэтому при разработке данной методики было выбрано шесть рекомендованных STS-

маркёров базового анализа. Разработанная методика предполагает использование лишь части праймеров, рекомендованных EAA/EMQN для проведения базового анализа [16] (табл. 2). Необходимость модификации остальных праймеров была связана с изменённым способом детекции продукта амплификации – проведением ПЦР в режиме реального времени.

В результате апробации методики с использованием образцов ДНК, полученных от мужчин с азооспермией и олигозооспермией тяжелой степени, было подтверждено наличие мутаций в 27(82%) образцах из 33. Согласно многочисленным исследованиям, у 10–20% мужчин с делециями в локусе AZF наиболее часто микроделения выявляются в субрегионе AZFc [23–25]. Это подтверждается и полученными нами данными: микроделения в субрегионе AZFc встречались в 17(63%) из 27 образцов ДНК. В 4(15%) образцах ДНК с выявленными делециями была подтверждена микроделения в субрегионе AZFa, что встречается существенно реже – у 1–5% мужчин с делециями в локусе AZF [26]. Сочетанные микроделения субрегионов AZFb, AZFb+c, AZFa+b+c были обнаружены в 6(22%) образцах ДНК.

Разработанная методика обладает всеми стандартными преимуществами ПЦР в режиме реального времени в сравнении с ПЦР, основанной на детекции продуктов с помощью электрофореза, главными из этих преимуществ являются время проведения анализа, меньшее количество этапов (трудоемкость) и более низкая контаминационная опасность. Предлагаемая методика, в отличие от протокола, рекомендованного EAA/EMQN [16], не предполагает исследования дополнительных мишеней, поэтому для решения диагностических задач, выходящих за рамки базового исследования распространённых микроделений субрегионов AZFa, AZFb и AZFc, может быть дополнительно (как отдельно, так и в комплексе) использован рекомендованный EAA/EMQN расширенный алгоритм исследования [16].

Заключение. Предлагаемая методика может быть использована как базовый диагностический инструмент для выявления микроделений субрегионов AZFa, AZFb и AZFc локуса AZF при проведении молекулярно-генетической диагностики мужского бесплодия.

Финансирование. Исследование не имело спонсорской поддержки.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

ЛИТЕРАТУРА (пп. 1 – 9, 16 – 26 см. REFERENCES)

10. Черных В.Б. AZF делеции – частая генетическая причина бесплодия у мужчин: современное состояние исследований. *Проблемы репродукции*. 2009; (1): 10-5.
11. Черных В. Б. Аномалии половых хромосом при нарушениях формирования пола и репродукции человека: Дисс.... д-ра мед. наук. М.; 2015.
12. Тулеева Л.Н., Аралбаева А.Н. Роль делеций гена AZFc в развитии мужского бесплодия. *Андрология*. 2015; (7): 42-5.
13. Барков И.Ю., Сорока Н.Е., Попова А.Ю., Гамидов С.И., Беляева Н.А., Глинкина Ж.И. и др. Диагностика мужского бесплодия, ассоциированного с микроделениями в локусе AZF хромосомы Y. *Акушерство и гинекология*. 2014; (1): 59-64.
14. Черных В.Б., Курило Л.Ф., Шилейко Л.В., Ширшова Л.С., Чухрова А.Л., Ковалевская Т.С., и др. Анализ микроделений в локусе AZF у мужчин с бесплодием: совместный опыт исследования. *Медицинская генетика*. 2003; (8): 367-79.

15. Беляева Н.А., Глинкина Ж.И., Калинина Е.А. Современные аспекты проблемы мужского бесплодия, ассоциированного с мутацией AZF локуса хромосомы Y. *Акушерство и гинекология*. 2012; 8(2): 21-7.

REFERENCES

1. Katherine L., O'Brien K.L., Varghese A.C., Agarwal A. The genetic causes of male factor infertility: A review. *Fertil. Steril.* 2010; 93(1): 1-12.
2. Stouffs K., Seneca S., Lissens W. Genetic causes of male infertility. *Ann. Endocrinol. (Paris)*. 2014; 75(2): 109-11.
- Massart A., Lissens W., Toumaye H., Stouffs K. Genetic causes of spermatogenic failure. *Asian J. Androl.* 2012; 14(1): 40-8.
3. Ghorbel M., Gargouri Baklouti S., Ben Abdallah F., Zribi N., Cherif M., Keskes R. et al. Chromosomal defects in infertile men with poor semen quality. *J. Assist. Reprod. Genet.* 2012; 29(5): 451-56.
4. Foresta C., Moro E., Ferlin A. Y chromosome microdeletions and alterations of spermatogenesis. *Endocr. Rev.* 2001; 22 (2): 226-39.
5. Liu X.G., Hu H.Y., Guo Y.H., Sun Y.P. Correlation between Y chromosome microdeletion and male infertility. *Genet. Mol. Res.* 2016; 15 (2).
6. Tiepolo L., Zuffardi O. Localization of factors controlling spermatogenesis in the nonfluorescent portion of the human Y chromosome. *Hum. Genet.* 1976; 34(2): 119-24.
7. Navarro-Costa P., Plancha C.E., Goncalves J. Genetic dissection of the AZF regions of the human Y chromosome: thriller or filler for male (in)fertility. *J. Biomed. Biotechnol.* 2010; 936569.
8. Yu X.W., Wei Z.T., Jiang Y.T., Zhang S.L. Y chromosome azoospermia factor region microdeletions and transmission characteristics in azoospermic and severe oligozoospermic patients. *Int. J. Clin. Exp. Med.* 2015; 8(9): 14634-46.
9. Chernykh V.B. AZF deletions - a frequent genetic cause of infertility in men: the current state of research. *Problemy reproduktivnoy meditsiny*. 2009; (1): 10-5. (in Russian)
10. Chernykh V.B. *Anomalies of sex chromosomes in disorders of sex formation and human reproduction*. Diss. Moscow; 2015. (in Russian)
11. Tuleeva L.N., Aralbaeva A.N. The role of deletions of the AZFc gene in the development of male infertility. *Andrologiya*. 2015; (7): 42-5. (in Russian)
12. Barkov I.Yu., Soroka N.E., Popova A.Yu., Gamidov S.I., Belyaeva N.A., Glinkina Zh.I. et al. Diagnosis of male infertility associated with microdeletions in the AZF locus of Y chromosome. *Akusherstvo i Ginekologiya*. 2014; (1): 59-64. (in Russian)
13. Chernykh V.B., Kurilo L.F., Shileyko L.V., Shirshova L.S., Chukhrova A.L., Kovalevskaya T.S. et al. Analysis of microdeletions in the AZF locus in men with infertility: joint research studies. *Meditsinskaya genetika*. 2003; (8): 367-79. (in Russian)
14. Belyaeva N.A., Glinkina Zh.I., Kalina E.A. Modern aspects of the problem of male infertility associated with the AZF mutation of the chromosome Y locus. *Akusherstvo i Ginekologiya*. 2012; 8(2): 21-7. (in Russian)
15. Krausz C., Hoefsloot L., Simoni M., Tüttelmann F. EAA/EMQN best practice guidelines for molecular diagnosis of Y-chromosomal microdeletions: state-of-the-art 2013. *Andrology*. 2014; 2(1): 5-19.
16. Suganthi R., Vijesh V., Jayachandran S., Fathima Benazir J.A. Multiplex PCR based screening for microdeletions in azoospermia factor region of Y chromosome in azoospermic and severe oligozoospermic south Indian men. *Iran. J. Reprod. Med.* 2013; 11(3): 219-26.
17. Wettasinghe T.K., Jayasekara R.W., Dissanayake V.H. Y chromosome microdeletions are not associated with spontaneous recurrent pregnancy loss in a Sinhalese population in Sri Lanka. *Hum. Reprod.* 2010; 25(12): 3152-6.
18. Shimizu A., Ichikawa T., Suzuki N., Yamazaki T., Imamoto T., Kojima S. et al. Microdeletions in the Y chromosome of patients with idiopathic azoospermia. *Asian. J. Androl.* 2002; 4(2): 111-5.
19. Zaimy M.A., Kalantar S.M., Sheikhha M.H., Jahaninejad T., Pashaifar H., Ghasemzadeh J. et al. The frequency of Yq microdeletion in azoospermic and oligospermic Iranian infertile men. *Iran. J. Reprod. Med.* 2013; 11(6): 453-8.
20. Peng D., Zhang Y.S., Zhang X.Y., Hu C., Liu M.H., Liu R.Z. An infertile 45, X male with a SRY-bearing chromosome 13: a clinical case report and literature review. *J. Assist. Reprod. Genet.* 2015; 32(1): 107-9.
21. Renwick P.J., Trussler J., Ostad-Saffari E., Fassihi H., Black C., Braude P. et al. Proof of principle and first cases using preimplantation genetic haplotyping—a paradigm shift for embryo diagnosis. *Reprod. Biomed. Online*. 2006; 13(1): 110-9.
22. Poongothai J., Gopenath T.S., Manonayaki S. Genetics of human male infertility. *Singapore Med. J.* 2009; 50(4): 336-47.
23. Navarro-Costa P., Goncalves J., Plancha C.E. The AZFc region of the Y chromosome: at the crossroads between genetic diversity and male infertility. *Hum. Reprod. Update*. 2010; 16(5): 525-42.
24. Yu X.W., Wei Z.T., Jiang Y.T., Zhang S.L. Y chromosome azoospermia factor region microdeletions and transmission characteristics in azoospermic and severe oligozoospermic patients. *Int. J. Clin. Exp. Med.* 2015; 8(9): 14634-46.
25. Hopps C.V., Mielnik A., Goldstein M., Palermo G.D., Rosenwaks Z., Schlegel P.N. Detection of sperm in men with Y chromosome microdeletions of the AZFa, AZFb and AZFc regions. *Hum. Reprod.* 2003; 18(8): 1660-5.

Поступила 13.09.17
Принята к печати 17.11.17