

Комплексное генетическое обследование пациентов с азооспермией и олигозооспермией тяжелой степени

Соловова О.А.^{1,2}, Опарина Н.В.², Сорокина Т.М.¹, Андреева М.В.¹, Хаят С.Ш.¹, Штаут М.И.¹, Коталевская Ю.Ю.², Латыпов А.Ш.², Курило Л.Ф.¹, Поляков А.В.¹, Черных В.Б.¹

1 — ФГБНУ «Медико-генетический научный центр имени академика Н.П. Бочкова»
115522, г. Москва, ул. Москворечье, д.1

2 — ГБУЗ МО «Московский областной научно-исследовательский клинический институт им. М. Ф. Владимирского»
129110, г. Москва, ул. Щепкина, д. 61/2

Введение. Тяжелые формы нарушения репродукции часто связаны с генетическими факторами. Однако по ряду причин медико-генетическое обследование и консультирование пациентов с бесплодием недостаточно эффективны, и вклад многих генетических факторов в генез нарушения фертильности остается недостаточно изученным. Комплексный подход к обследованию с использованием различных клинических, цитогенетических и молекулярно-генетических методов позволяет улучшить диагностику генетически обусловленных форм нарушения фертильности, в частности связанных с азооспермией или олигозооспермией тяжелой степени.

Цель: повышение эффективности медико-генетического обследования и консультирования пациентов с азооспермией и олигозооспермией.

Методы. В отобранную выборку включены 200 мужчин с азооспермией ($n=172$) и олигозооспермией тяжелой степени ($n=28$). Пациентам выполнено клиническое, андрологическое и лабораторно-инструментальное обследование: УЗИ органов мошонки, сперматологическое, гормональное, цитогенетическое, молекулярно-цитогенетическое (FISH) и молекулярно-генетическое исследование локусов или генов, связанных с нарушением мужской фертильности (AZF, гены *CFTR*, *AR*).

Результаты. Различные генетические факторы нарушения фертильности обнаружены у 99 (49,5%) из 200 пациентов, в том числе у 76 (45,7%) мужчин с азооспермией и у 23 (82,1%) пациентов с олигозооспермией. Муковисцидоз и синдром CBAVD диагностированы у 4,5% пациентов, врожденный гипогонадотропный гипогонадизм – у 7,5% мужчин. Аномалии кариотипа обнаружены у 52 (26,8%) пациентов, включая синдром Клайнфельтера (47,XXY; $n=34$), дисомию Y (47,XY; $n=6$), 46,XX тестикулярную форму нарушения формирования пола ($n=3$), сбалансированные аномалии аутосом ($n=9$). По результатам FISH-анализа у пациентов с анеупloidией по половым хромосомам не обнаружено скрытого мозаицизма. Патогенные микроделеции Y-хромосомы в локусе AZF (Yq11.2) обнаружены у 16 (8%) пациентов. Патогенные варианты в гене *CFTR* детектированы у 9 пациентов с муковисцидозом и синдромом CBAVD.

Выводы. Использование комплексного генетического обследования позволяет существенно повысить эффективность диагностики генетически обусловленных форм мужского бесплодия, связанного с тяжелыми формами патозооспермии. Для выявления редких несиндромальных генетических форм нарушения фертильности, связанных с генными вариантами и вариациями числа копий, необходимо применение массового параллельного секвенирования, хромосомного микроматричного анализа и других методов геномного анализа.

Ключевые слова: мужское бесплодие, азооспермия, олигозооспермия, гипогонадизм, хромосомные аномалии, синдром Клайнфельтера, AZF, CBAVD, муковисцидоз, микроделеции, Y-хромосома.

Для цитирования: Соловова О.А., Опарина Н.В., Сорокина Т.М., Андреева М.В., Хаят С.Ш., Штаут М.И., Коталевская Ю.Ю., Латыпов А.Ш., Курило Л.Ф., Поляков А.В., Черных В.Б. Комплексное генетическое обследование пациентов с азооспермией и олигозооспермией тяжелой степени. *Медицинская генетика* 2021; 20(12): 12-22.

DOI: 10.25557/2073-7998.2021.12.12-22

Автор для корреспонденции: Соловова О.А.; **e-mail:** olga_pilyaeva@list.ru

Финансирование. Работа выполнена в рамках государственного задания Минобрнауки России для ФГБНУ «МГНЦ» на выполнение НИР в 2021 году.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Поступила: 01.12.2021

Comprehensive genetic examination of azoospermic and severe oligozoospermic patients

Solovova O.A.^{1,2}, Oparina N.V.², Sorokina T.M.¹, Andreeva M.V.¹, Khayat S.Sh.¹, Shtaut M.I.¹, Kotalevskaya Yu.Yu.², Latypov A.Sh.², Kurilo L.F.¹, Polyakov A.V.¹, Chernykh V.B.¹

1 — Research Centre for Medical Genetic
1, Moskvorechie st., Moscow, 115522, Russian Federation

2 — Moscow Regional Research and Clinical Institute (MONIKI)
61/2, Schepkina st., Moscow, 129110, Russian Federation

Background. Severe forms of reproduction disorders are often associated with genetic factors. However, for a number of reasons, medical and genetic examination and counseling of infertile patients are not effective enough, and the contribution of many genetic factors to the genesis of fertility disorders remains insufficiently studied. An integrated approach using various clinical, cytogenetic and molecular genetic methods in the examination makes it possible to improve the diagnosis of genetically determined forms of fertility disorders, in particular those associated with severe azoospermia or oligozoospermia.

Aim: improving the effectiveness of medical and genetic examination and counseling of patients with severe azoospermia and oligozoospermia.

Methods. The selected sample included 200 men with azoospermia ($n=172$) and severe oligozoospermia ($n=28$). The patients underwent clinical, andrological and laboratory-instrumental examination: ultrasound of the scrotum, spermatological, hormonal, cytogenetic, molecular cytogenetic (FISH) and molecular genetic examination of loci or genes associated with male fertility disorders (AZF, CFTR, AR).

Results. Various genetic factors of male infertility were found in 99 (49.5%) of 200 patients, including 76 (45.7%) men with azoospermia and 23 (82.1%) patients with severe oligozoospermia. Cystic fibrosis and CBAVD syndrome were diagnosed in 4.5% of patients, congenital hypogonadotropic hypogonadism – in 7.5% of men. Karyotype abnormalities were found in 52 (26.8%) patients, including Klinefelter syndrome (47,XXY; $n=34$), disomy Y (47,XYY; $n=6$), 46,XX-testicular disorder of sex development ($n=3$), balanced autosomal abnormalities ($n=9$). According to the results of the FISH analysis, no cryptic mosaicism was found in patients with sex chromosomes aneuploidy. Pathogenic Y chromosome microdeletions in the AZF locus (Y q11.2) were found in 16 (8%) patients. Pathogenic variants of the CFTR gene were detected in 9 patients with cystic fibrosis and CBAVD syndrome.

Conclusions. Comprehensive genetic examination can significantly improve the effectiveness of the diagnosis of genetically determined forms of male infertility associated with severe pathozoospermia. To identify rare non-syndromic genetic forms of male fertility associated with gene variants and copy number variations, it is necessary to use massive parallel sequencing, array comparative genomic hybridization and other genomic analysis methods.

Keywords: male infertility, azoospermia, oligozoospermia, hypogonadism, chromosome anomalies, Klinefelter syndrome, AZF, CBAVD, cystic fibrosis, microdeletions, Y-chromosome.

For citation: Solovova O.A., Oparina N.V., Sorokina T.M., Andreeva M.V., Khayat S.Sh., Shtaut M.I., Kotalevskaya Yu.Yu., Latypov A.Sh., Kurilo L.F., Polyakov A.V., Chernykh V.B. Comprehensive genetic examination of azoospermic and severe oligozoospermic patients. *Medicinskaya genetika [Medical genetics]* 2021; 20(12): 12-22. (In Russ.)

DOI: 10.25557/2073-7998.2021.12.12-22

Corresponding author. Solovova O.A.; e-mail: olga_pilyaeva@list.ru

Funding. The research was carried out within the state assignment of Ministry of Science and Higher Education of the Russian Federation.

Conflict of interest. The authors declare no conflict of interest.

Accepted: 01.12.2021

Введение

В большинстве случаев нарушение фертильности у мужчин связано со снижением количественных и качественных параметров мужских гамет. Азооспермия (отсутствие сперматозоидов в эякуляте) и олигозооспермия тяжелой степени (снижение количества сперматозоидов менее 5 млн/мл) относятся к тяжелым формам патозооспермии и могут быть обусловлены генетическими, негенетическими факторами или их сочетанием [1]. Необструктивная азооспермия (НОА) и олигозооспермия тяжелой степени – близкие по тяжести формы патозооспермии, которые частично перекрываются по своим этиологи-

ческим факторам, в том числе генетическим. Причины и механизмы развития мужского бесплодия, связанные с генетическими факторами, разнообразны и могут быть обусловлены нарушением развития органов половой системы, первичным поражением гонад, нарушением функционирования гипоталамо-гипофизарной системы и гормональной регуляции, нарушением сперматогенеза и мейоза, обструкцией семявыносящих путей и др. Чаще всего причиной как синдромальных, так и несиндромальных генетических форм мужского бесплодия являются хромосомные аномалии, патогенные вариации числа копий (CNV). В боль-

шинстве случаев это аномалии половых хромосом (гоносом) и микроделеции локуса AZF Y-хромосомы. Также описаны многочисленные патогенные варианты нуклеотидной последовательности в различных генах, контролирующих сперматогенез и мужскую фертильность (*CFTR*, *TEX11*, *AR*, *SYCP3* и др.) [2].

Несмотря на большой арсенал методов диагностики, эффективность выявления причин нарушения фертильности относительно невысока. Пациентам с бесплодием относительно редко выполняют комплексное медико-генетическое обследование и консультирование. Частота и спектр генетических нарушений, приводящих к разным формам мужского бесплодия, остаются недостаточно исследованными. Практическое применение возможностей клинической генетики в медицине существенно отстает от научных знаний. Вследствие этого зачастую даже синдромальные варианты тяжелых форм патозооспермии, например, врожденный гипогонадотропный гипогонадизм, некоторые формы нарушения формирования пола (НФП), синдром СВАВД (врожденная двусторонняя аплазия семявыносящих протоков) остаются без выявленной генетической причины или диагностируются поздно. В настоящее время в России отсутствуют какие-либо стандарты генетического обследования пациентов с мужским бесплодием. Для комплексной диагностики при мужском бесплодии Американская и Европейская ассоциации урологов рекомендуют проводить стандартное цитогенетическое исследование (СЦИ) всем мужчинам с подозрением на НОА, а также с показателями общего количества сперматозоидов в эякуляте менее 10 млн/мл, пациентам с количеством сперматозоидов в эякуляте менее 5 млн/мл – исследование на наличие микроделетий Y-хромосомы в локусе AZF, а при подозрении на обструктивную форму азооспермии (ОА) или синдром СВАВД – анализ патогенных вариантов и аллеля 5T гена *CFTR* [3]. Следует учитывать, что генетически обусловленные нарушения фертильности у мужчин не всегда проявляются тяжелыми формами патозооспермии и клинически выраженными фенотипическими изменениями. Кроме того, следует также учитывать, что у пациентов с патозооспермией могут отмечаться как изолированные, так и сочетанные генетические нарушения и факторы. Например, у пациентов с хромосомными аномалиями одновременно могут встречаться микроделеции Y-хромосомы, патогенные варианты в гене *CFTR* [4,5].

В нашем исследовании проведено комплексное клиническое, лабораторно-инструментальное и молекулярно-генетическое обследование отобранной группы пациентов с азооспермией и олигозооспермией тяжелой степени с целью повышения эффективно-

сти выявления генетических нарушений при мужском бесплодии и для создания алгоритма их диагностики.

Материалы и методы

Выборка для исследования сформирована на основании данных ретроспективного и проспективного обследования крупной когорты из 3787 мужчин, обратившихся для проведения сперматологического исследования в ФГБНУ «МГНЦ», а также направленных из отделения вспомогательных репродуктивных технологий (ВРТ) МОПЦ (г. Балашиха), консультативного отделения медико-генетического центра ГБУЗ МО «МОНИКИ им. М.Ф. Владимирского», отделения андрологии и урологии ФГБУ «НМИЦ АГП им. В.И. Кулакова» для проведения медико-генетического консультирования и обследования по поводу проблем деторождения в браке, связанных с мужским фактором.

Критерии включения пациентов в исследование:

1. Репродуктивный возраст (18-60 лет).

2. Первичное бесплодие, обусловленное наличием азооспермии, олигозооспермии тяжелой степени.

Критерии исключения пациентов из исследования:

1. Возраст младше 18 и старше 60 лет.

2. Достоверно установленные вторичные (приобретенные) причины тестикулярной недостаточности (травмы и воспалительные заболевания органов мошонки, врожденные аномалии, прием цитотоксических или анаболических лекарственных препаратов, облучение, воздействие высоких температур, опухоли и перекрут яичка, хирургические операции в анамнезе, нарушающие кровоснабжение яичек и приводящие к их атрофии).

3. Другие формы патоспермии (аспермия, олигозооспермия нетяжелой степени, астенозооспермия, тератозооспермия, выраженная лейкоспермия, гемоспермия).

После применения вышеперечисленных критериев в настоящее исследование включены 200 пациентов, из которых у 172 пациентов выявлена азооспермия и у 28 пациентов – олигозооспермия тяжелой степени. Возраст пациентов составил от 18 до 48 лет (средний возраст $30,5 \pm 5,7$).

Исследование одобрено комитетом по биомедицинской этике при ФГБНУ «МГНЦ». Все пациенты подписали добровольное информированное согласие на участие в исследовании.

Клиническое обследование включало сбор анамнеза и генеалогической информации, осмотр. На каждого пациента заполняли генетическую карту с составлением родословной и специально разработанный для исследования опросный лист, касающийся анамнеза

жизни и заболевания, наличия патологии со стороны других органов и систем, ранее проведенных лабораторно-инструментальных исследований, приобретенных факторов, влияющих на репродуктивную систему и фертильность. Из анализа родословных известно, что два пациента, имеющие НОА неясного генеза, являются родными братьями (сибсами). Остальные 198 пациентов между собой не родственны, случаи азооспермии и тяжелой олигозооспермии среди их близких родственников не отмечены.

Сперматологическое исследование проводили согласно стандартной методике, рекомендованной общепринятым руководством ВОЗ [1]. Гормональный профиль включал исследование уровней ФСГ, ЛГ и тестостерона в сыворотке крови (методом ELISA).

СЦИ (анализ кариотипа) выполняли на ФГА-стимулированных лимфоцитах периферической крови в соответствии с общепринятым протоколом [6]. Для визуализации бэндинга хромосом использовали GTG-метод дифференциального окрашивания. Анализировали от 20 до 30 метафазных пластинок каждого образца [7].

Флуоресцентную *in situ* гибридизацию (FISH) выполняли на препаратах интерфазных ядер культивированных и некультивированных лимфоцитов периферической крови, некультивированных клеток буккального эпителия. Для определения числа копий хромосом использовали ДНК-зонды, специфичные к центромерным районам X/Y-хромосом (DXZ1 и DYZ3, соответственно), аутосом 7 или 18 (D7Z1 и D18Z1, соответственно) (Kreatech, Leica, Нидерланды). Сигналы от аутосомных зондов использовали в качестве внутреннего контроля реакции. Для детекции структурной перестройки у пациентов с 46,XX инверсией пола использовали зонд LSI SRY (локус Yp11.31) (Gene CytoCell Ltd., Oxford Technology, Великобритания). Предгибризационную подготовку и гибридизацию выполняли согласно протоколу производителя (Poseidon, Kreatech, Leica, Нидерланды). Количество проанализированных клеток для каждого образца составило от 100 до 200 в каждой исследуемой ткани. Для визуализации метафазных GTG-окрашенных хромосом и флуоресценции гибридизационных сигналов использовали микроскоп Nikon Eclipse Ci (Nikon Corporation, Япония) с программным обеспечением ВидеоТестКарио 3.1 (Видеотест, Россия) и LUCIA Cytogenetics – FISH (LUCIA Cytogenetics, Чехия). Результаты исследований записаны в соответствии с Международной цитогеномной номенклатурой ISCN, 2020 [8].

Детекцию делеций в локусе AZF выполняли методом мультиплексной полимеразной цепной реакции

(мПЦР) с исследованием набора STS-маркеров (*SRY* и *ZFX/ZFY* (внутренний контроль), *sY84*, *sY86*, *sY615*, *sY1316*, *sY1235*, *sY121*, *sY127*, *sY134*, *sY1197*; *sY254*, *sY255*, *sY1125*), рекомендованных Руководством по лабораторной диагностике микроделений Y-хромосомы [9].

При исследовании гена *CFTR* методами анализа полиморфизма длин амплификационных фрагментов (ПДАФ) и мультиплексной амплификации лигированных проб (MLPA) выполняли детекцию 22 наиболее частых в РФ патогенных вариантов: *c.54-5940_273+10250del21kb (CFTRdele2,3)*, *c.1521_1523delCTT (F508del)*, *c.2051_2052delAAinsG (2183AA>G)*, *c.1545_1546delTA (1677delTA)*, *c.2012delT (2143delT)*, *c.2052dupA (2184insA)*, *c.262_263delTT (394delTT)*, *c.3691delT (3821delT)*, *c.413_415dupTAC (L138ins)*, *c.1624G>T (G542X)*, *c.3846G>A (W1282X)*, *c.3909C>G (N1303K)*, *c.1000C>T (R334W)*, *c.3718-2477C>T (c.3717+12191C>T; 3849+10kbC>T)*, *c.472_473insA (604insA)*, *c.3816_3817delGT (3944delGT)*, *c.3587C>G (S1196X)*, *c.489+1G>T (621+1G>T)*, *c.274G>A (E92K)*, *c.3140-26A>G (3272-26A>G)*, *c.3883delA (4015delA)* и *c.3890-3891insT (4022insT)*. Методом «вложенной» ПЦР исследовали полиморфный локус IVS8-Tn в интроне 8 гена *CFTR*.

Анализ числа (CAG)-повторов в экзоне 1 гена андрогенового рецептора (*AR/HUMARA*) выполняли методом ПЦР-ПДАФ в соответствии с утвержденной медицинской технологией ФГБНУ «МГНЦ» [10].

Результаты

При клиническом и эндокринологическом обследовании у 43 из 200 пациентов установлен нормогонадотропный гипогонадизм, у 99 (49,5%) мужчин выявлен гипергонадотропный гипогонадизм, у 15 (7,5%) – гипогонадотропный гипогонадизм. У остальных 86 (43%) пациентов снижения уровня тестостерона в сыворотке крови не выявлено. У 15 (7,5%) из 200 пациентов диагностирован врожденный гипогонадотропный гипогонадизм, из них у 11 выявлена нормосмия, у 4 – синдром Каллмана с аносмией ($n=2$) или гипосмией ($n=2$). Диагноз гипогонадотропного гипогонадизма устанавливали, исходя из данных анамнеза и результатов клинико-лабораторного обследования, включающего неполное развитие вторичных половых признаков, а также снижение уровня гонадотропинов (ФСГ, ЛГ) и тестостерона. У пациентов с синдромом Каллмана в сочетании с аносмией ($n=2$) отмечали истинную двустороннюю гинекомастию, ожирение 2 степени. Средний возраст постановки диагноза составлял $17,8 \pm 3,5$ лет. У 2 из 15 пациентов с врожденным гипогонадотропным гипогонадизмом отмечали оли-

гозооспермию тяжелой степени, у остальных 13 пациентов, включая пациентов с синдромом Каллмана ($n=4$), выявлена НОА. У всех пациентов установлен нормальный мужской кариотип (46,XY). При анализе родословных все случаи являлись спорадическими, определить тип наследования не представляется возможным. Молекулярно-генетическое исследование генов, ассоциированных с врожденным гипогонадотропным гипогонадизмом, этой группе пациентов не проводилось. Трём пациентам без нарушения обоняния проводилась длительная терапия препаратами хорионического гонадотропина. У них через 1-2 года после начала лечения отмечены нормогонадотропный нормогонадизм, улучшение сперматологической картины (нетяжелая олигозооспермия), увеличился объем тестикул, и у супруг двух пациентов наступила самостоятельная беременность, родились дети. Пациенты с нарушением обоняния не планируют деторождение, в связи с чем им проводится постоянная гормон-заместительная терапия препаратами тестостерона.

У 6 пациентов с азооспермией отмечен муковисцидоз (МВ), из них у 2 пациентов диагностирована легочная форма, у 4 – смешанная форма заболевания. Диагноз МВ всем пациентам был установлен в детском возрасте. Пациенты наблюдались и лечились в специализированных центрах МВ. Кроме того, у трех пациентов с азооспермией диагностировано изолированное поражение семявыносящих протоков (*vas deferens*) – синдром СВАВД без клинической картины классического МВ. У этих пациентов по данным клинического и сперматологического исследований установлены азооспермия или олигоспермия (объем эякулята менее 1,5 мл), низкий pH <7,0. Таким образом, у 9 муж-

чин (4,5% пациентов) диагностирован МВ ($n=6$) или синдром СВАВД ($n=3$). Генотипы пациентов, а также выявленные варианты IVS8-Тп-полиморфизма в гене *CFTR* у пациентов с НОА и олигозооспермией тяжелой степени приведены в **табл. 1**.

У всех 6 пациентов с МВ выявлено наличие двух патогенных вариантов гена *CFTR*: у обоих мужчин с легочной формой МВ выявлен нетяжелый генотип F508del/3849+10kbC>T, у всех 4 пациентов со смешанной формой – гомозиготность по наиболее частому тяжелому патогенному варианту гена *CFTR* – мутации F508del (**табл. 1**). У мужчин с синдромом СВАВД обнаружено наличие патогенного варианта гена *CFTR* в гетерозиготном состоянии, в том числе у двух пациентов в сочетании с 5Т-аллелем ($n=2$). Гетерозиготное носительство патогенного варианта или 5Т-аллеля гена *CFTR* выявлено у трех пациентов с азооспермией, не имеющих МВ и СВАВД. Среди пациентов с олигозооспермией тяжелой степени не обнаружено патогенных вариантов и 5Т-аллеля гена *CFTR* (**табл. 1**).

СЦИ выполнено 194 пациентам (всем пациентам, кроме больных МВ). По результатам СЦИ у 52 (26,8%) из 194 обследованных мужчин обнаружены аномалии кариотипа, в том числе у 42 пациентов с азооспермией и у 10 пациентов с олигозооспермией тяжелой степени (**табл. 2**).

Наиболее частой аномалией кариотипа являлся синдром Клайнфельтера (СК), который диагностирован у 34 из 194 (17%) пациентов (**табл. 2**). У всех диагностирована НОА. У шести пациентов (у 4 из которых выявлена НОА, а у двух – олигозооспермия) выявлена дисомия Y (кариотип 47,XY²). У трех мужчин с НОА диагностирована 46,XX инверсия пола

Таблица 1

Результаты анализа гена *CFTR* в исследованной выборке пациентов ($n=200$)

Группы пациентов (n , количество пациентов)	Выявленные заболевания/ варианты гена <i>CFTR</i>	Генотип по гену <i>CFTR</i> (n , количество пациентов)
Мужчины с азооспермией ($n=178$)	Муковисцидоз ($n=6$)	F508del/3849+10kbC>T ($n=2$)
		F508del/F508del ($n=4$)
	Синдром СВАВД ($n=3$)	dele2,3(21kb)/N, 7T/7T
		R334W/N, 5T/7T
		F508del/N, 5T/9T
Гетерозиготное носительство патогенного варианта или 5Т гена <i>CFTR</i> ($n=3$)	F508del /N, 7T/7T ($n=1$) N/N, 5T/7T ($n=2$)	
Норма ($n=160$)	N/N, 7T/7T ($n=111$) N/N, 7T/9T ($n=49$)	
Мужчины с олигозооспермией тяжелой степени ($n=28$)	Норма ($n=28$)	N /N, 7T/7T ($n=24$) N/N, 7T/9T ($n=4$)

(46,XX тестикулярная форма НФП или синдром де ля Шапелля). По результатам ПЦР-анализа последовательностей Y-хромосомы у двух пациентов с 46,XX тестикулярной формой НФП выявлено наличие гена *SRY* (*sex-determining region of Y* – пол-детерминирующего региона Y-хромосомы), у одного последовательности *SRY* не обнаружено (табл. 2). При проведении метафазного FISH-анализа у обоих (*SRY*⁺) 46,XX мужчин обнаружена транслокация X;Y: кариотип по результатам СЦИ и FISH определен как 46,XX,ish der(X)t(X;Y)(p22.3;p11.3). У третьего пациента с 46,XX тестикулярной формой НФП выявлено отсутствие гена *SRY* (и других Y-специфичных локусов) по данным ПЦР и FISH-анализа на лимфоцитах периферической крови. Данному пациенту планируется дополнительное молекулярно-генетическое исследование для выявления причины 46,XX-инверсии пола. FISH-анализ, выполненный пациентам с аномалиями половых хромосом или 46,XX инверсией пола, не выявил наличие скрытого мозаицизма по половым хромосомам в лимфоцитах периферической крови и клетках буккального эпителия.

У 9 (4,6%) из 194 мужчин, которым выполнено СЦИ, обнаружены аномалии аутосом: робертсоновские транслокации с вовлечением хромосом 13 и 14 ($n=4$), реципрокные транслокации между хромосомами 12 и 18 ($n=1$) и между хромосомами 11 и 22 ($n=1$), а также перицентрические инверсии хромосом 6, 13 и 16 ($n=3$). При этом у 8 носителей аутосомных аномалий выявлена олигозооспермия и только у одного диагностирована азооспермия (табл. 2). Таким образом, среди пациентов с азооспермией, у ко-

торых выявлены аномалии кариотипа, преобладали аномалии в системе половых хромосом (41/42), среди мужчин с олигозооспермией тяжелой степени – аномалии аутосом (8/10).

Анализ микроделечий хромосомы Y выполнен у 194 обследованных мужчин (кроме 6 пациентов с MB) (табл. 3). Делеции Y-специфичных маркеров в локусе AZF детектированы у 26 из 194 (13,4%) пациентов, включая трех с 46,XX инверсией пола, у которых не обнаружено всех исследованных маркеров локуса AZF (делеция AZFa+b+c) из-за отсутствия хромосомы Y и скрытого мозаицизма по ней. У остальных 23 пациентов с микроделечиями в хромосоме Y диагностирован нормальный мужской кариотип (46,XY). У 16 пациентов обнаружены полные патогенные AZF-делеции, которые захватывали один или два AZF-региона: AZFb ($n=3$), AZFc ($n=8$), AZFb+c ($n=5$). У 7 пациентов делеции являлись частичными, в том числе у 2 пациентов в регионе AZFa (sY1316 в гене *USP9Y*), а у 5 пациентов с олигозооспермией тяжелой степени выявлены полиморфные микроделечии с захватом отдельных маркеров в регионе AZFb/палиндроме P3 (sY1197, $n=2$) или дистальной области региона AZFc (sY1125, $n=3$). Наиболее частой в обследованной выборке являлась полная делеция региона AZFc (делеция b2/b4), выявленная у 8/16 (50%) мужчин с патогенными микроделечиями хромосомы Y. У остальных 168 пациентов микроделечии хромосомы Y не обнаружены.

Исследование (CAG)_n-полиморфного локуса в экзоне 1 гена *AR* выполнено у 85 пациентов с нормальным мужским кариотипом, у которых не об-

Таблица 2

Результаты СЦИ пациентов с азооспермией и олигозооспермией тяжелой степени

Варианты кариотипа/ хромосомные аномалии	Форма патозооспермии	
	Азооспермия, ($n=166$)	Олигозооспермия тяжелой степени, ($n=28$)
Гоносомные анеусомии:	38	2
47,XXY (синдром Клайнфельтера)	34	-
47,XYY (дисомия Y)	4	2
46,XX-инверсия пола	3	-
<i>SRY</i> (+)	2	-
<i>SRY</i> (-)	1	-
Аномалии аутосом:	1	8
45,XY,der(13;14)(q10;q10)	-	4
46,XY,t(12;18)(p10;q10)	-	1
46,XY,t(11;22)(q23;q11)	-	1
46,XY,inv(6)(p11q12)	1	-
46,XY,inv(13)(p11.2q14.1)	-	1
46,XY,inv(16)(p13.1q24)	-	1
Нормальный мужской кариотип (46,XY)	124	18

наружено патогенных микроделечий локуса AZF Y-хромосомы и патогенных вариантов в гене *CFTR*, а также трем пациентам с СК и всем пациентам с 46,XX тестикулярной формой НФП/синдромом де ля Шапелля ($n=3$). Количество (CAG)-повторов варьировало от 18 до 30. Гетерозиготности по аллельным вариантам гена *AR*, а также наличия «коротких» CAG-повторов ($n \leq 17$) среди обследованных пациентов с кариотипом 46,XY не выявлено. У 4 (4,7%) из 85 обследованных пациентов выявлено повышенное ($n=27-30$) число тринуклеотидных повторов. У всех мужчин с 46,XX тестикулярной формой НФП выявлено по два аллеля гена *AR* с разным числом (CAG)-повторов. У пациентов с СК длина (CAG)-повторов экзона 1 составляла 19/26, 21/27 и 21/24, соответственно.

Таким образом, синдромальные формы генетически обусловленного мужского бесплодия обнаружены у 78 из 200 (39%) пациентов с азооспермией и олигозооспермией тяжелой степени. У 16 (8%) пациентов обнаружены несиндромальные генетически обусловленные формы патозооспермии, вызванные патогенными микроделечиями хромосомы Y. Еще у 10 пациентов выявлены частичные делеции в локусе AZF или носительство патогенных вариантов или аллеля 5T гена *CFTR*. В итоге у 99 из 200 (49,5%) пациентов выяв-

лены генетические факторы нарушения мужской фертильности.

Обсуждение

В нашей выборке частота хромосомных аномалий, обнаруженных у мужчин с азооспермией и олигозооспермией, составила 27%, что примерно в 1,5-2 раза выше, чем средние ее значения в более ранних публикациях [11]. Отчасти это связано с относительно высоким числом сбалансированных аномалий аутосом (робертсоновских и реципрокных транслокаций, перичентрических инверсий), обнаруженных у обследованных нами пациентов с олигозооспермией. Возможно, это обусловлено особенностями выборки и более тщательным отбором пациентов. Аномалии аутосом обнаружены у 4,5% пациентов (у одного мужчины с азооспермией и у 8 пациентов с олигозооспермией тяжелой степени). Сбалансированные аутосомные аномалии часто не приводят к выраженным нарушениям мейоза и сперматогенеза, отмечаемым у пациентов с НОА, поэтому их чаще выявляют у мужчин с олигозооспермией [12]. Наши результаты подтверждают результаты предыдущих зарубежных исследований о том, что гоносомные аномалии в основном встречаются у пациентов с азооспермией, в то время как аномалии аутосом — у мужчин, име-

Таблица 3

Микроделечии в AZF-регионе хромосомы Y, выявленные в исследованной выборке пациентов ($n=194$)

AZF регион Y-хромосомы	Тип делеции	Делетированные маркеры в локусе AZF Y-хромосомы	Сперматологический диагноз	Число наблюдений, (n)
AZFa+b+c (46,XX- инверсия пола)	Отсутствие длинного и части короткого плеча Y-хромосомы	sY84, sY86, sY615, sY1316; sY1235, sY121, sY127, sY134, sY1197; sY254, sY255, sY1125 (все исследованные маркеры)	Азооспермия	3
AZFa	частичная	sY1316	Азооспермия	1
			Олигозооспермия тяжелой степени	1
AZFb+c	Полная (P5-Yq ter)	sY1235, sY121, sY127, sY134, sY1197; sY254, sY255, sY1125	Азооспермия	3
AZFb+c	Полная (P5-distal P1)	sY1235, sY121, sY127, sY134, sY1197; sY254, sY255	Азооспермия	2
AZFb	Полная (P5-proximal P1)	sY1235, sY121, sY127, sY134, sY1197	Азооспермия	3
AZFb	Частичная (делеция AZFb в палиндроме P3)	sY1197	Олигозооспермия тяжелой степени	2
AZFc	Полная (b2/b4)	sY254, sY255	Азооспермия ($n=3$) Олигозооспермия тяжелой степени ($n=5$)	8
AZFc	Частичная	sY1125	Олигозооспермия тяжелой степени	3

ющих олигозооспермию тяжелой степени [13]. Многие сбалансированные аномалии, например, инверсии аутосом, а также некоторые реципрокные транслокации и часть Робертсоновских транслокаций не сопровождаются выраженными нарушениями мейоза и тяжелыми формами патозооспермии [14]. Поэтому они являются генетическими факторами, оказывающими предрасполагающее действие на развитие азооспермии и тяжелой олигозооспермии, при этом тяжелые формы мужского бесплодия и патозооспермии у носителей этих перестроек, в основном, вызваны другими генетическими или негенетическими причинами. Возможно, что часть обнаруженных аутосомных аномалий, в частности перичентрические инверсии, не являются причинами НОА и олигозооспермии тяжелой степени, связанных с нарушением сперматогенеза, поскольку их наличие в кариотипе сперматоцитов не приводит к выраженным дефектам мейоза, например, к блоку сперматогенеза в профазе I мейоза и нарушению созревания мужских половых клеток [14]. В случае выявления у мужчин с азооспермией и олигозооспермией тяжелой степени аномалий хромосом, для которых не характерны тяжелые формы патозооспермии, следует провести дополнительное генетическое исследование для выявления причин нарушения сперматогенеза и репродуктивной функции (микроделеции Y-хромосомы, патогенные варианты гена *CFTR* и др.).

В нашей работе не выполнялось исследование набора хромосом в сперматозоидах в связи с отсутствием или крайне низкой концентрацией сперматозоидов в эякуляте. Поскольку пациенты с аномалиями хромосом могут иметь повышенную частоту анеуплоидных гамет, пациентам, у которых можно оценить анеуплоидию в мужских гаметах (кроме пациентов с азооспермией и экстремально выраженной олигозооспермией), актуально молекулярно-цитогенетическое исследование сперматозоидов (FISH). Это позволяет оценить тип мейотической рекомбинации и долю нормальных/сбалансированных и несбалансированных гамет у носителей сбалансированных хромосомных аномалий, а также анеуплоидию по половым хромосомам и некоторым аутосомам, например, у пациентов с численными или структурными аномалиями гоносом, с мозаицизмом по половым хромосомам. Результаты FISH-исследования могут иметь принципиальное значение в оценке возможности использования для экстракорпорального оплодотворения (ЭКО) собственных гамет и в выборе тактики решения проблемы деторождения у мужчин с нарушением фертильности, являющихся носителями хромосомных аномалий.

Наиболее частой генетической причиной мужского бесплодия в нашей выборке, так же, как и в исследова-

ниях других авторов [15], является СК. Данный вариант анеуплоидии по гоносомам обнаружен у 17% пациентов обследованной нами выборки, что примерно соответствует средней его частоте 12–15% у мужчин с азооспермией. Отсутствие олигозооспермии тяжелой степени у пациентов с СК может быть обусловлено относительно небольшой группой пациентов с данной формой патозооспермии в нашей выборке, а также меньшей частотой олигозооспермии у пациентов с СК, особенно с мозаичной формой, для которой характерна НОА вследствие более тяжелых форм нарушения сперматогенеза вплоть до синдрома «только клетки Сертоли» и гиалиноза извитых семенных канальцев.

У 6 пациентов нашей выборки выявлена дисомия хромосомы Y (синдром Якобса), из них у четырех пациентов диагностирована азооспермия, а у двух — олигозооспермия тяжелой степени. Сперматологический диагноз у мужчин с кариотипом 47,XYU может значительно варьировать (от нормозооспермии, различных умеренно тяжелых форм патозооспермии до олигозооспермии тяжелой степени и азооспермии). Репродуктивная функция, фертильность у них чаще всего не нарушены, а риск наследования дисомии Y низкий. Это обусловлено тем, что дополнительная Y-хромосома теряется в большинстве незрелых мужских половых клеток до их вступления в мейоз или в ходе мейотических делений. У мужчин с дисомией Y часть сперматоцитов на стадии пахитены содержит тривалент XYU и может вступать в мейоз с образованием спермиев с кариотипом 24,XX и 24,XY, что приводит к повышению частоты анеуплоидии и снижению мужской фертильности [16].

В настоящем исследовании частота 46,XX мужчин в выборке пациентов с азооспермией и олигозооспермией тяжелой степени составила 1,5%, что соответствует данным других исследователей (1,36%) [15]. Нарушение сперматогенеза у пациентов с 46,XX тестикулярной формой НФП обусловлено отсутствием генов локуса AZF хромосомы Y, которые необходимы для деления и дифференцировки мужских половых клеток, созревания сперматозоидов. Поэтому у 46,XX мужчин, а также у мужчин с протяженными делециями в локусе AZF (AZFa+b+c, AZFb+c) при гистологическом исследовании биоптатов тестикул обнаруживают полное отсутствие сперматогенного эпителия в извитых семенных канальцах (синдром «только клетки Сертоли») [17].

В исследованной нами выборке второе место по частоте встречаемости генетических факторов нарушения мужской фертильности занимают микроделеции хромосомы Y. Согласно полученным нами данным, частота микроделеций локуса AZF у пациентов с азооспер-

мией или тяжелой олигозооспермией составила 13,4%, что соответствует результатам других исследований [18]. Около 75% всех обнаруженных нами микроделечий в локусе AZF являлись патогенными, то есть обуславливали наличие тяжелой формы патозооспермии вследствие нарушения сперматогенеза. Наиболее частой микроделечией хромосомы Y, также как у других исследователей, являлась делеция, целиком захватывающая регион AZFc (делеция b2/b4) [19]. В нашей выборке ее доля в структуре патогенных микроделечий хромосомы Y составила 50%. По данным других авторов ее частота достигает 65–70% всех патогенных микроделечий длинного плеча хромосомы Y. У 50–70% мужчин с полными делециями AZFc возможно получение сперматозоидов, пригодных для искусственного оплодотворения методом ЭКО/ICSI, из эякулята при олигозооспермии, или из биоптата яичка при азооспермии в случае частично сохраненного сперматогенеза [20]. В отличие от них пациенты с «тяжелыми» типами микроделечий – делециями AZFb+c, AZFb и AZFa характеризуются отсутствием сперматогенного эпителия в извитых семенных канальцах (синдром «только клетки Сертоли») или полным мейотическим блоком, поэтому у них не удается получить сперматозоиды для ЭКО/ICSI, в том числе при биопсии яичка [21]. Делеции с утратой регионов AZFc и/или AZFb составили 50% от всех полных AZF делеций, обнаруженных в обследованной выборке. При выявлении данных типов делеций, а также полных делеций AZFa и делеций всего локуса AZF биопсия тестикул с целью получения сперматозоидов нецелесообразна в связи с ее неэффективностью [17].

Врожденный гипогонадотропный гипогонадизм/синдром Каллмана, выявленный у 7,7% пациентов, занял третье место среди генетических причин тяжелых форм мужского бесплодия в нашем исследовании, что сравнимо с его средней частотой (4%) среди мужчин с бесплодием, связанным с тяжелыми формами нарушений сперматогенеза [22]. В отличие от многих других генетически обусловленных форм бесплодия пациенты с гипогонадотропным гипогонадизмом имеют больший шанс на успешное решение проблемы деторождения, иногда не прибегая к методам ЭКО. Об этом свидетельствуют отмеченные в семьях части обследованных нами пациентов с гипогонадотропным гипогонадизмом/синдромом Каллмана наступление беременности и рождение детей.

Распространенность синдрома CBAVD среди мужчин с азооспермией оценивается в 4–17%, а при обструктивной форме азооспермии составляет до 25% [23]. В нашем исследовании выявлено три пациента с данным синдромом, что соответствует 1,5%

в общей выборке и 33% среди пациентов с обструктивной азооспермией. Азооспермия обусловлена двусторонней обструкцией семявыносящих путей на уровне придатка и/или семявыносящих протоков, аплазией семенных пузырьков. Относительно большое число пациентов с MB в нашей выборке обусловлено параллельно проводимым научным исследованием репродуктивного статуса пациентов с MB. Практически у всех пациентов с MB/CBAVD удается получить сперматозоиды и использовать их в программах ЭКО/ICSI. При этом необходимо рекомендовать обследование супруге на частые мутации в гене *CFTR*, а в случае выявления носительства – проведение преимплантационного генетического тестирования (ПГТ-М) [24].

У четырех пациентов в нашей выборке выявлено повышенное количество (CAG)-повторов в экзоне 1 гена *AR*, $n=27-30$. В других исследованиях показано лишь опосредованное влияние этого полиморфного локуса гена *AR* на сперматогенез и мужскую фертильность и только в сочетании с другими факторами [25]. Однако следует отметить, что данные варианты так же, как полиморфные делеции хромосомы Y не являются патогенными. Их анализ позволяет выявить полные мутации (CAG)-полиморфного локуса (количество повторов 42 и более), характерные для спино-бульбарной мышечной атрофии (болезни Кеннеди), и тем самым диагностировать данное заболевание до появления неврологической симптоматики [25]. Кроме того, данное исследование у мужчин с нарушением фертильности позволяет выявлять гетерозиготность по гену андрогенового рецептора, что может указывать на наличие СК, 46,XX инверсии пола, скрытого гоносомного мозаицизма.

Таким образом, генетические причины тяжелых форм мужского бесплодия, включающие численные гоносомные аномалии, синдром де ля Шапелля, Робертсоновские транслокации, MB и синдром CBAVD, врожденный гипогонадотропный гипогонадизм, патогенные микроделечии локуса AZF хромосомы Y суммарно выявлены у 43,5% пациентов. Очевидно, что столь высокая доля генетических вариантов обусловлена не только комплексностью клинического, андрологического и медико-генетического обследования, но и особенностями выборки, в частности более строгим отбором пациентов.

Пациентам с несиндромальными формами азооспермии и олигозооспермии неясного генеза, у которых не выявлены генетические нарушения репродукции при СЦИ, необходимо рекомендовать использование методов геномного исследования (например, секвенирование экзона или генома, хромосомный микроматричный анализ). Их использование позволит оценить вклад различных патогенных вариантов и ва-

риаций числа копий (CNV) в структуру причин данных форм патозооспермии.

Литература

1. Руководство ВОЗ по исследованию и обработке эякулята человека (5-е издание) М.: «Капитал Принт», 2012. 291 с.
2. Oud M.S., Volozonoka L., Smits R.M., et al. A systematic review and standardized clinical validity assessment of male infertility genes. *Hum Reprod* 2019; 34(5):932-941. doi: 10.1093/humrep/dez022.
3. EAU Guidelines: Male Infertility. URL: <https://uroweb.org/guideline/male-infertility>.
4. Li L.X., Dai H.Y., Ding X.P., et al. Investigation of AZF microdeletions in patients with Klinefelter syndrome. *Genet Mol Res*. 2015; 14(4): 15140-15147. doi: 10.4238/2015.
5. Pan Y., Zhang H.G., Xi Q.I., et al. Molecular microdeletion analysis of infertile men with karyotypic Y chromosome abnormalities. *J Int Med Res*. 2018; 46(1): 307-315. doi: 10.1177/0300060517719394.
6. Рубцов Н.Б. Методы работы с хромосомами млекопитающих: учебное пособие. Новосибирск: НГУ, 2006. 147 с.
7. Кузнецова Т.В., Шилова Н.В., Творогова М.Г., Харченко Т.В., Лебедев И.Н., Антоненко В.Г. Практические рекомендации по обеспечению качества и надежности цитогенетических исследований. *Медицинская генетика*. 2019;18(5):3-27
8. ISCN 2020. An International System for Human Cytogenomic Nomenclature (2020) Editor(s): McGowan-Jordan J., Hastings R. J., Moore S., Karger.2020;503. Reprint of: *Cytogenetic and Genome Research* 2020; 160(7-8).
9. Simoni M., Bakker E., Krausz C. EAA/EMQN best practice guidelines for molecular diagnosis of y-chromosomal microdeletions. State of the art 2004. *Int J Androl*. 2004; 27(4):240-249. doi: 10.1111/j.1365-2605.2004.00495.x.
10. Шагина О.А., Миронович О.Л., Забненкова В.В. и др. Экспансия CAG-повтора в экзоне 1 гена AR у больных спинальной амиотрофией. *Медицинская генетика* 2017; 16(9): 31-36.
11. Ghorbel M., Gargouri Baklouti S., Ben Abdallah F., et al. Chromosomal defects in infertile men with poor semen quality. *J Assist Reprod Genet*. 2012; 29(5):451-456. doi: 10.1007/s10815-012-9737-7.
12. Kuroda S., Usui K., Sanjo H., et al. Genetic disorders and male infertility. *Reprod Med Biol*. 2020;19(4): 314-322. doi: 10.1002/rmb2.12336.
13. Fu L., Xiong D.K., Ding X.P., et al. Genetic screening for chromosomal abnormalities and Y chromosome microdeletions in Chinese infertile men. *J Assist Reprod Genet*. 2012; 29(6): 521-527. doi: 10.1007/s10815-012-9741-y.
14. Gardner R.J.M., Amor D.J. Gardner and Sutherland's Chromosome Abnormalities and Genetic Counseling (5 ed.). Oxford University Press 2018. doi: 10.1093/med/9780199329007.001.0001.
15. Gao M. et al. Karyotype analysis in large sample cases from Shenyang Women's and Children's hospital: a study of 16,294 male infertility patients. *Andrologia*. 2017 May;49(4). doi: 10.1111/and.12649.
16. Rives N., Milazzo J.P., Miraux L., et al. From spermatocytes to spermatozoa in an infertile XYY male. *Int J Androl*. 2005; 28(5): 304-310. doi: 10.1111/j.1365-2605.2005.00540.x.
17. Park .S.H., Lee H.S., Choe J.H., Lee J.S., Seo J.T. Success rate of microsurgical multiple testicular sperm extraction and sperm presence in the ejaculate in korean men with y chromosome microdeletions. *Korean journal of urology*. 2013 Aug 1;54(8):536-40. doi: 10.4111/kju.2013.54.8.536.
18. Naase Y., Charoute H., El Houate B. et al. Chromosomal abnormalities and Y chromosome microdeletions in infertile men from Morocco. *BMC Urol*. 2015 Sep 18;15:95. doi: 10.1186/s12894-015-0089-3.
19. Lardone M.C., Ortega V., Ortiz E., et al. Partial-AZFc deletions in Chilean men with primary spermatogenic impairment: gene dosage and Y-chromosome haplogroups. *J Assist Reprod Genet*. 2020 Dec;37(12):3109-3119. doi: 10.1007/s10815-020-01957-6.
20. Sabbaghian M., Mohseni Meybodi A., Rafae A., et al. Sperm retrieval rate and reproductive outcome of infertile men with azoospermia factor c deletion. *Andrologia*. 2018 Sep;50(7):e13052. doi: 10.1111/and.13052.
21. Park S.H., Lee H.S., Choe J.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 Aug;54(8):536-40. doi: 10.4111/kju.2013.54.8.536.
22. Festa A., Umamo G.R., Miraglia Del Giudice E., et al. Genetic Evaluation of Patients With Delayed Puberty and Congenital Hypogonadotropic Hypogonadism: Is it Worthy of Consideration? *Front Endocrinol (Lausanne)*. 2020 May 19;11:253. doi: 10.3389/fendo.2020.00253.
23. Bieth E., Hamdi S.M., Mieuisset R. Genetics of the congenital absence of the vas deferens. *Hum Genet*. 2021;140(1): 59-76. doi: 10.1007/s00439-020-02122-w.
24. Chamayou S., Sicali M., Lombardo D., Alecci C., Ragolia C., Maglia E., Liprino A., Cardea C., Storaci G., Romano S., Guglielmino A. Universal strategy for preimplantation genetic testing for cystic fibrosis based on next generation sequencing. *J Assist Reprod Genet*. 2020 Jan;37(1):213-222. doi: 10.1007/s10815-019-01635-2.
25. Меликян Л.П., Близнец Е.А., Поляков А.В. и др. Полиморфизм CAG-повторов в экзоне 1 гена андрогенового рецептора у российских мужчин с нормозооспермией и патозооспермией. *Генетика*. 2020; 56(8): 974-980.

References

1. Rukovodstvo VOZ po issledovaniyu i obrabotke eyakulyata cheloveka (5-e izdaniye) [WHO laboratory manual for the examination and processing of human semen - 5th ed.]. М.: «Kapital Print» [М.: "Capital Print"], 2012. 291 p.
2. Oud M.S., Volozonoka L., Smits R.M., et al. A systematic review and standardized clinical validity assessment of male infertility genes. *Hum Reprod* 2019; 34(5):932-941. doi: 10.1093/humrep/dez022.
3. EAU Guidelines: Male Infertility. URL: <https://uroweb.org/guideline/male-infertility>.
4. Li L.X., Dai H.Y., Ding X.P., et al. Investigation of AZF microdeletions in patients with Klinefelter syndrome. *Genet Mol Res*. 2015; 14(4): 15140-15147. doi: 10.4238/2015.
5. Pan Y., Zhang H.G., Xi Q.I., et al. Molecular microdeletion analysis of infertile men with karyotypic Y chromosome abnormalities. *J Int Med Res*. 2018; 46(1): 307-315. doi: 10.1177/0300060517719394.
6. Rubtsov N.B. Metody raboty s hromosomami mlekopitayushchih: uchebnoe posobie. [Methods for working with mammalian chromosomes]. Novosibirsk: NSU 2006. 147p. (In Russ.)
7. Kuznetsova T.V., Shilova N.V., Tvorogova M.G., Kharchenko T.V., Lebedev I.N., Antonenko V.G. Prakticheskie rekomendacii po obespecheniju kachestva i nadezhnosti cytogeneticheskikh issledovanij. [Practical recommendations to ensure quality and safety of cytogenetic research]. *Medicinskaja genetika*. [Medical Genetics.] 2019; 18(5):3-27. (In Russ.) <https://doi.org/10.25557/2073-7998.2019.05.3-27>
8. ISCN 2020. An International System for Human Cytogenomic Nomenclature (2020) Editor(s): McGowan-Jordan J., Hastings R. J., Moore S., Karger.2020;503. Reprint of: *Cytogenetic and Genome Research* 2020; 160(7-8).
9. Simoni M., Bakker E., Krausz C. EAA/EMQN best practice guidelines for molecular diagnosis of y-chromosomal microdeletions. State of the art 2004. *Int J Androl*. 2004; 27(4):240-249. doi: 10.1111/j.1365-2605.2004.00495.x.

10. Shchagina O.A., Mironovich O.L., Zabnenkova V.V. et al. Ekspansiya CAG-povtora v ekzone 1 gena AR u bol'nykh spinal'noy amiotrofiyey [CAG expansion in exon 1 of the AR gene in Russian spinal atrophy patients]. *Meditinskaya genetika* [Medical Genetics] 2017; 16(9): 31-36. (In Russ.)
11. Ghorbel M., Gargouri Baklouti S., Ben Abdallah F., et al. Chromosomal defects in infertile men with poor semen quality. *J Assist Reprod Genet.* 2012; 29(5):451-456. doi: 10.1007/s10815-012-9737-7.
12. Kuroda S., Usui K., Sanjo H., et al. Genetic disorders and male infertility. *Reprod Med Biol.* 2020;19(4): 314-322. doi: 10.1002/rmb2.12336.
13. Fu L., Xiong D.K., Ding X.P., et al. Genetic screening for chromosomal abnormalities and Y chromosome microdeletions in Chinese infertile men. *J Assist Reprod Genet.* 2012; 29(6): 521-527. doi: 10.1007/s10815-012-9741-y.
14. Gardner R.J.M., Amor D.J. Gardner and Sutherland's Chromosome Abnormalities and Genetic Counseling (5 ed.). Oxford University Press 2018. doi: 10.1093/med/9780199329007.001.0001.
15. Gao M. et al. Karyotype analysis in large sample cases from Shenyang Women's and Children's hospital: a study of 16,294 male infertility patients. *Andrologia.* 2017 May;49(4). doi: 10.1111/and.12649.
16. Rives N., Milazzo J.P., Miraux L., et al. From spermatocytes to spermatozoa in an infertile XYY male. *Int J Androl.* 2005; 28(5): 304-310. doi: 10.1111/j.1365-2605.2005.00540.x.
17. Park .S.H., Lee H.S., Choe J.H., Lee J.S., Seo J.T. Success rate of microsurgical multiple testicular sperm extraction and sperm presence in the ejaculate in korean men with y chromosome microdeletions. *Korean journal of urology.* 2013 Aug 1;54(8):536-40. doi: 10.4111/kju.2013.54.8.536.
18. Naasse Y., Charoute H., El Houate B. et al. Chromosomal abnormalities and Y chromosome microdeletions in infertile men from Morocco. *BMC Urol.* 2015 Sep 18;15:95. doi: 10.1186/s12894-015-0089-3.
19. Lardone M.C., Ortega V., Ortiz E., et al. Partial-AZFc deletions in Chilean men with primary spermatogenic impairment: gene dosage and Y-chromosome haplogroups. *J Assist Reprod Genet.* 2020 Dec;37(12):3109-3119. doi: 10.1007/s10815-020-01957-6.
20. Sabbaghian M., Mohseni Meybodi A., Rafee A., et al. Sperm retrieval rate and reproductive outcome of infertile men with azoospermia factor c deletion. *Andrologia.* 2018 Sep;50(7):e13052. doi: 10.1111/and.13052.
21. Park S.H., Lee H.S., Choe J.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 Aug;54(8):536-40. doi: 10.4111/kju.2013.54.8.536.
22. Festa A., Umamo G.R., Miraglia Del Giudice E., et al. Genetic Evaluation of Patients With Delayed Puberty and Congenital Hypogonadotropic Hypogonadism: Is it Worthy of Consideration? *Front Endocrinol (Lausanne).* 2020 May 19;11:253. doi: 10.3389/fendo.2020.00253.
23. Bieth E., Hamdi S.M., Mieuisset R. Genetics of the congenital absence of the vas deferens. *Hum Genet.* 2021;140(1): 59-76. doi: 10.1007/s00439-020-02122-w.
24. Chamayou S., Sicali M., Lombardo D., Alecci C., Ragolia C., Maglia E., Liprino A., Cardea C., Storaci G., Romano S., Guglielmino A. Universal strategy for preimplantation genetic testing for cystic fibrosis based on next generation sequencing. *J Assist Reprod Genet.* 2020 Jan;37(1):213-222. doi: 10.1007/s10815-019-01635-2.
25. Melikyan P.L., Bliznetz E.A., Polyakov A.B. et al. Polimorfizm CAG-povtorov v ekzone 1 gena androgenovogo retseptora u rossiyskikh muzhchin s normozoospermiey i patozoospermiey [CAG repeat polymorphism in exon 1 of the androgen receptor gene in Russian men with normozoospermia and pathozoospermia]. *Genetika* [Russian Journal Of Genetics] 2020; 56(8): 974-980-7. (In Russ.)