

**Agrita Puzuka**

**VĪRIEŠU REPRODUKTĪVĀS PATOLOĢIJAS  
ĢENĒTISKO RISKA FAKTORU IZVĒRTĒJUMS  
LATVIJAS POPULĀCIJĀ**

**Promocijas darba kopsavilkums**

(specialitāte – medicīniskā ģenētika)

**Promocijas darba zinātniskie vadītāji:**

**RSU prof., Dr.h.biol. Astrīda Krūmiņa**

**LŪ prof., Dr.biol. Viesturs Baumanis**



Darbs tapis ar ESF projekta „Atbalsts doktorantiem studiju programmas apguvei un zinātniskā grāda ieguvei Rīgas Stradiņa universitātē” atbalstu

**Rīga, 2011**

Prk - 3829

4092/99

RĪGAS STRADIŅA UNIVERSITĀTE

**Agrita Puzuka**

**VĪRIEŠU REPRODUKTĪVĀS PATOLOĢIJAS  
ĢENĒTISKO RISKA FAKTORU IZVĒRTĒJUMS  
LATVIJAS POPULĀCIJĀ**

**Promocijas darba kopsavilkums**

(specialitāte – medicīniskā ģenētika)

**Promocijas darba zinātniskie vadītāji:**

**RSU prof., Dr.h.biol. Astrīda Krūmiņa**

**LU prof., Dr.biol. Viesturs Baumanis**



Darbs tapis ar ESF projekta „Atbalsts doktorantiem studiju programmas apguvei un zinātniskā grāda ieguvei Rīgas Stradiņa universitātē” atbalstu

**Rīga, 2011**

0221002649

Promocijas darbs izstrādāts Rīgas Stradiņa universitātes Molekulārās ģenētikas zinātniskajā laboratorijā un Latvijas Valsts Biomedicīnas pētījumu centrā

**Darba zinātniskie vadītāji:**

RSU prof., Dr.h.biol. Astrīda Krūmiņa

LU prof., Dr.biol. Viesturs Baumanis

**Oficiālie recenzenti:**

RSU asoc.prof., Dr.biol. Edvīns Miklaševics

Dr.biol. Jānis Kloviņš

LU prof., Dr.h.biol. Īzaks Rašals

Promocijas darba aizstāvēšana notiks 2011. gada 24. janvārī plkst. 16.00  
Rīgas Stradiņa universitātes promocijas padomes atklātajā sēdē Hipokrāta auditorijā,  
Rīgā, Dzirciema ielā 16

Ar promocijas darbu var iepazīties RSU bibliotēkā.



Promocijas padomes sekretāre:

Dr. habil. med., profesore

Līga Aberberga - Augškalne

## Anotācija

Neauglība ir aktuāla mūsdienu problēma. Šī problēma skar 10 – 15% pāru, un aptuveni puse šo gadījumu ir saistīta ar vīrieša neauglību. Vīrieša neauglības ģenētiskie iemesli meklējami vīrišķā dzimuma normālu attūstību un spermatogēnēzes procesus nosakošajos gēnos, kas lokalizēti gan cilvēka Y hromosomā, gan autosomās.

Cilvēka Y hromosomā lokalizētie fertilitātes marķiergēni ļauj pētīt neauglīgo vīriešu Y hromosomas AZF (azoospermijas) reģionu mikrodelēcijas un to korelāciju ar vīriešu neauglību. Ieviešot spermatogēnēzes traucējumu molekulāri ģenētisko analīzes meto­di, tika noteikts, ka Y hromosomas mikrodelēciju biežums vīriešiem ar idiopātisku neauglību ir 5% un AZF mikrodelēcijas novēro azoospermijas vai smagas oligozoospermijas gadījumā. Tika izstrādāts algoritms, kas var palīdzēt ārš­tiem atlasīt vīrieša neauglības gadījumus, kuros ir svarīgi noteikt Y hromosomas mikrodelēcijas.

Cilvēka Y hromosomai raksturīgos polimorfismus, bialēliskos marķierus un mikrosatelītus veiksmīgi iespējams izmantot, lai noteiktu “neauglības haplogrupu” eksistenci. Pētot Y haplogrupu izplatību vīriešiem ar idiopātisku neauglību un kontroles grupai (latvieši trijās paudzēs), atrastas statistiski ticamas atšķirības, kas liecina par noteiktu Y hromosomas variantu – “neauglības” haplogrupu iespējamību.

Ir zināma korelācija ar cilvēka 7. hromosomā lokalizētā gēna *CFTR* mutācijām un vīriešu neauglību. Analizējot Latvijas neauglīgo vīriešu un kontroles grupas paraugu gēna *CFTR* delF508, R117H mutācijas, kā arī 8. introna poli-T un poli-TG polimorfismus, netika atklāta statistiski nozīmīga šo mutāciju un polimorfismu saistība ar vīriešu neauglību, kas norāda, ka gēnam *CFTR* nav tiešas ietekmes uz spermatogēnēzes procesu.

Pētījuma ietvaros analizēto vīriešu neauglības ģenētiskā riska iemeslu apzināšana aizpilda līdz šim Latvijā neaplūkotu molekulārās ģenētikas aspektu un ir nozīmīga šo pacientu ģenētiskajai konsultēšanai.



## Annotation

Infertility is a topical problem nowadays. This problem affects approximately 10-15% of couples and about half of the cases refer to male infertility. Genetic reasons for male infertility should be looked in genes that are involved in normal male development and spermatogenesis processes. Those genes are located on human Y chromosome and on autosomes.

Fertility markers-genes localised on human Y-chromosome enable scientists to study Y-chromosomal AZF (azoospermia) region microdeletions and their correlation with male infertility. The method of molecular genetic analysis of spermatogenesis disturbances has been introduced; and it has been found that frequency of Y chromosome microdeletions among infertile males is 5%, and AZF microdeletions were observed in cases of azoospermia or severe oligozoospermia. An algorithm has been developed, which can help select those infertility cases, when detection of Y chromosome microdeletions is purposeful.

Polymorphisms, characteristic to human Y chromosome, - biallelic markers and microsatellites – can be successfully applied for detection of existence of “infertility haplogroups”. Studying incidence of Y haplogroups in the infertile males and control group, statistically significant differences have been found, which suggests possibility of existence of certain Y chromosome variants – “infertility” haplogroups.

Positive correlation exists between male infertility and mutations or polymorphisms found in *CFTR* gene (localised on human chromosome 7). Analyzing *CFTR* gene mutations delF508, R117H, as well as 8<sup>th</sup> intron poly-T and poly-TG polymorphisms in males with idiopathic infertility and control group, statistically significant relation of these mutations and polymorphisms with male infertility was not found, which indicates that *CFTR* gene does not affect spermatogenesis process directly.

Gathering information about the cause of genetic risk of male infertility, the study deals with molecular genetic aspect that has not been studied in Latvia up to now, and is significant in genetic counselling of these patients.

## Pētījuma aktualitāte

Neauglība ir aktuāla mūsdienu problēma. Šī problēma skar aptuveni 10 – 15% pāru, un aptuveni pusē gadījumu neauglīgi ir vīrieši. Vairāk nekā 60% gadījumu vīrieša reproduktīvo funkciju traucējumu iemesls nav zināms, t.i., nav atklājams ar klīniskiem izmeklējumiem. No zināmajiem biežāk novērotajiem neauglības cēloņiem lielākā nozīme ir hormonālas dabas traucējumiem, kā arī citoģenētiskajai patoloģijai. Šīs ģenētiskās izmaiņas galvenokārt meklējamas normālu vīrišķā dzimuma attīstību un spermatogēnēzes procesus nosakošajos gēnos, kas lokalizēti gan cilvēka Y hromosomā, gan autosomās.

Cilvēka Y hromosomas garā pleca eihromatiskajā rajonā atrodas AZF (azoospermijas faktors) lokuss, kurā lokalizēti gēni, kas atbild par normālu spermatogēnēzes norisi, līdz ar to par vīrieša auglību. AZF reģions sastāv no trim rajoniem – AZFa, AZFb un AZFc. Šie rajoni satur gēnus, no kuru ekspresijas ir atkarīga vīrieša fertilitāte. Ir zināms, ka neauglīgiem vīriešiem, kuriem klīniski diagnosticēta ar spermas kvantitāti vai kvalitāti saistīta patoloģija, Y hromosomas AZF rajonos ir atklātas mikrodelēcijas. Turklāt no tā, kurā AZF rajonā ir lokalizētas šīs mikrodelēcijas, ir atkarīga neauglības smaguma pakāpe. Mikrodelēcijas AZFa rajonā aptur spermatogēnēzes procesu tā sākumstadijā; izlocītajos sēklas kanāliņos neatrod vīrišķās germinatīvās šūnas. Savukārt mikrodelēcijas AZFb rajonā apstādina spermatogēnēzes procesu pirms germinatīvo šūnu meiotiskās dalīšanās, bet dažādi samazināta spermatozoīdu skaita un defektīvas morfoloģijas varianti ir AZFc rajona mikrodelēciju sekas. Latvijā Y mikrodelēciju analīze līdz šim nebija veikta.

Uzskata, ka vīriešu neauglību izraisošie ģenētiskie faktori korelē ar kādiem noteiktiem Y hromosomai raksturīgiem neitrāliem polimorfismiem vai mikrosatelītu variantiem. Par pamatu izmantojot Latvijas populāciju raksturojošos Y hromosomas haplogrupu un mikrosatelītu datus, ir iespējams noskaidrot, vai saglabājas tādi paši varianti ar līdzīgu frekvenci, arī analizējot neauglīgu vīriešu DNS paraugus.

Tā kā ir zināms, ka vīriešiem ar idiopātisku neauglību Y hromosomas mikrodelēcijas atrod ~ 10% gadījumu, tad jādodomā arī par citu ģenētiska rakstura mehānismu esamību, kuriem ir būtiska nozīme vīriešu neauglības attīstībā. Viens no tādiem faktoriem ir mutācijas un polimorfismi cistiskās fibrozes izcelsmē iesaistītajā gēnā *CFTR*. Smaga šī gēna kodētā proteīna nepietiekamība vīriešiem izpaužas kā *vas*

*deferens* trūkums (*Congenital bilateral absence of vas deferens, CBAVD*) un obstruktīva azoospermija. Biežākās mutācijas gēnā *CFTR*, kas korelē ar vīriešu neauglību, ir delF508 un R117H, kā arī poli-T un poli-TG trakta 5T/12TG alēles klātbūtne gēna *CFTR* 8. intronā.

## Darba mērķis

Veikt idiopātiskas vīriešu neauglības molekulāri ģenētisko izpēti Latvijā.

## Darba uzdevumi

1. Atlasītu pacientu grupai ar idiopātiskiem spermatoģenēzes traucējumiem noteikt Y hromosomas garā pleca AZFa, AZFb un AZFc rajonu mikrodelēcijas.
2. Veikt eksistējošo Y hromosomas mikrodelēciju analīzes metožu salīdzinājumu, lai izvērtētu to piemērotību ātrai un precīzai Y hromosomas mikrodelēciju noteikšanai molekulārās ģenētikas laboratorijā.
3. Izstrādāt algoritmu, kas ļautu ārstiem-andrologiem atlasīt pacientus, kam svarīgi noteikt Y hromosomas mikrodelēcijas.
4. Aprobēt un ieviest Latvijā ērtu un efektīvu Y hromosomas mikrodelēciju analīzes metodi kā vīriešu neauglības molekulārās diagnostikas veidu.
5. Vīriešiem ar idiopātisku neauglību noteikt Y hromosomas neitrālo polimorfismu variantus – Y haplogrupas un haplotipus, kā arī izvērtēt saistību starp noteiktām Y hromosomas haplogrupām un spermatoģenēzes traucējumiem.
6. Veikt Y hromosomas mikrodelēciju analīzi vīrišķā dzimuma cistiskās fibrozes slimniekiem ar zināmiem gēna *CFTR* mutāciju variantiem.
7. Neauglīgiem vīriešiem analizēt gēna *CFTR* mutāciju delF508 un mutāciju R117H, kā arī noteikt 8. introna poli-T un poli-GT polimorfismus.
8. Veikt gēna *CFTR* 8. introna poli-T un poli-GT polimorfismu salīdzinājumu neauglīgiem vīriešiem un kontroles grupas vīriešiem.

## Darba zinātniskā novītāte

Darba novītāte ir līdz ūim Latvijā nenoskaidroto vīriešu neauglības molekulāri ģenētisko faktoru izpēte. Noskaidrots, ka vīriešiem ar azoospermiju un smagu oligozoospermiju Y hromosomas mikrodelēciju biežums ir 5%, kas atbilst ūo mikrodelēciju frekvencei citās Eiropas valstīs. Noteikta Y hromosomas variantu – Y haplogrupu korelācija ar spermatoģenēzes traucējumiem. Apzināti ģēna *CFTR* divu mutāciju (*delF508* un *R117H*) un poli-T/poli-TG polimorfismu varianti vīriešiem ar idiopātisku neauglību. Pirmoreiz Latvijā parādīta neauglības molekulāri ģenētiskās izpētes nozīme vīriešu reproduktīvās patoloģijas diagnostikā, neauglības ģenētisko faktoru asociācijas pētījumos un ģenētiskajā konsultēšanā.

## Darba praktiskā nozīme

Darba ietvaros izstrādāta un ieviesta ērta un efektīva spermatoģenēzes traucējumu molekulārā analīzes metode, ar kuras palīdzību Latvijā iespējams diagnosticēt Y hromosomas mikrodelēcijas. Izveidots algoritms, kas varētu palīdzēt ārstiem atlasīt vīrieša neauglības gadījumus, kuros ir svarīgi noteikt Y hromosomas mikrodelēcijas. Ieteikts veikt molekulāri ģenētisko analīzi visiem idiopātiskās neauglības gadījumiem, kad hormonu līmenis un kariotips ir normāls, bet spermatozoīdu skaits ir  $<5 \times 10^6/\text{mL}$ . Mikrodelēciju analīze vīriešiem ar vieglākām neauglības formām nav rekomendējama, jo Y hromosomas mikrodelēciju biežums ūajā grupā ir ļoti zems. Y hromosomas mikrodelēciju analīze ļauj precizēt neauglības diagnozi, atklāt slimības etioloģiju, turklāt tā ir informatīva neauglības ģenētiskajā konsultēšanā, it īpaši pirms mākslīgās apaugļošanas veikšanas.

## **Darba struktūra un apjoms**

Promocijas darbs uzrakstīts latviešu valodā. Tas sastāv no 7 nodaļām: ievada, literatūras apskata, materiāliem un metodēm, rezultātiem, diskusijas, secinājumiem un literatūras saraksta. Ievadā atspoguļots darba mērķis un uzdevumi, kā arī parādīta darba zinātniskā novitāte un praktiskais nozīmīgums. Pamatnodaļas veidotas no aktuālās zinātniskās literatūras analīzes par darbā pētītajām problēmām, izmantoto metožu apraksta, no pētījumos iegūto rezultātu apraksta un analīzes, un kritiska salīdzinājuma ar literatūras datiem. Pamatnodaļu noslēdz secinājumi. Literatūras sarakstā ietverti 205 izmantoto darbu nosaukumi. Kopējais darba apjoms ir 150 lapaspuses, iekļauti 17 attēli un 15 tabulas, pievienoti 5 pielikumi.

## **Darba izstrādes vieta, laiks un finansējums**

Promocijas darbs izstrādāts Rīgas Stradiņa universitātes Molekulārās ģenētikas zinātniskajā laboratorijā un Latvijas Valsts Biomedicīnas pētījumu centrā laika posmā no 2005. līdz 2010. gadam.

Promocijas darbs izstrādāts Latvijas Zinātnes padomes (LZP) grantu Nr. 04.1198 „Y hromosomas molekulārā polimorfisma pētījumi vīriešu reproduktīvās patoloģijas un populācijas raksturojumam”, LZP sadarbības projekta Nr. 05.0023 „Latvijas populācijas molekulāri ģenētiskais raksturojums” un LZP sadarbības projekta Nr. 10.0010 “Slimību etioloģijas, patoģenēzes un cilvēka novecošanās procesu ģenētiskā izpēte Latvijas populācijā” ietvaros.

Darbs tapis ar Eiropas Sociālā fonda (ESF) projekta „Atbalsts doktorantiem studiju programmas apguvei un zinātniskā grāda ieguvei Rīgas Stradiņa universitātē” atbalstu.

## Materiāls un metodes

### *Paraugi*

Pētījumā izmantoti 100 neauglīgu vīriešu DNS paraugi, kas iegūti no šo pacientu perifērajām asinīm (1. tabula). Pētījumā iekļautie pacienti bija 24 – 46 gadus veci. Vidējais neauglības ilgums bija 4,5 gadi (robežās no 1 līdz 20 gadiem). Visi pacienti pirms asins parauga nodošanas tika iepazīstināti ar informāciju par ģenētiskiem pētījumiem un ir parakstījuši piekrišanas formas. Pētījums ir apstiprināts Centrālajā medicīnas ētikas komitejā.

Neauglīgo vīriešu atlases kritēriji bija sekojoši:

- Idiopātiski azoospermijas (nav spermatozoīdu), oligozoospermijas ( $<20 \times 10^6$  spermatozoīdi/ml), teratozoospermijas (anomālijas spermatozoīdu kustīgumā un galviņas morfoloģijā) gadījumi;
- No pētījuma tika izslēgti visi azoospermijas un oligospermijas gadījumi, kuru iemesls ir izlocīto sēklas kanāliņu trūkums (*CBAVD*) vai nosprostojums, endokrīnās sistēmas traucējumi, citoģenētiska patoloģija vai kādi citi zināmi traucējumi, kas var izraisīt neauglību.

Kontroles grupām tika izmantoti šādi paraugi no RSU Molekulārās ģenētikas zinātniskās laboratorijas kolekcijas (1. tabula):

- Lai veiktu Y hromosomas haplogrupu salīdzinājumu, kā kontroles tika izmantoti 153 vīriešu (trīs paaudzēs latvieši, nav radnieciski pa mātes un tēva līniju) DNS paraugi;
- Lai veiktu gēna *CFTR* poli-T un poli-TG polimorfismu salīdzinājumu, kā kontroles tika izmantoti 60 vīriešu (latvieši trīs paaudzēs, nav radnieciski pa mātes un tēva līniju) DNS paraugi, kā arī 15 DNS paraugi, kas iegūti no cistiskās fibrozes vīrišķā dzimuma pacientiem.

1. tabula. Pārskats par analizētajiem paraugiem

Indivīdu / analizēto DNS paraugu skaits	Analīzes nosaukums	Analīzes metodes
100 neauglīgi vīrieši	Y hromosomas mikrodēlēciju analīze	Multipleksās polimerāzes ķēdes reakcijas ( <i>polymerase chain reaction, PCR</i> )
	Y hromosomas haplogrupu analīze	<i>PCR</i> ar tai sekojošu restrikcijas fragmentu garuma polimorfisma ( <i>RFLP</i> ) analīzi un DNS sekvenēšana
	Y hromosomas haplotipu analīze	Y hromosomas mikrosatelītu ( <i>Y-STR</i> jeb <i>DYS</i> ) genotipēšana
	Gēna <i>CFTR</i> mutācijas delF508 analīze	<i>PCR</i> ar tai sekojošu heterodupleksu analīzi
	Gēna <i>CFTR</i> mutācijas R117H analīze	<i>PCR</i> ar tai sekojošu <i>RFLP</i> analīzi
	Gēna <i>CFTR</i> poli-T un poli-TG polimorfisma analīze	DNS sekvenēšana
153 vīrieši (latvieši trīs paaudzēs) – kontroles grupa	Y hromosomas haplogrupu analīze	<i>PCR</i> ar tai sekojošu <i>RFLP</i> analīzi un DNS sekvenēšana
	Gēna <i>CFTR</i> poli-T un poli-TG polimorfisma analīze	DNS sekvenēšana
15 vīrieši, cistiskās fibrozes pacienti	Y hromosomas mikrodēlēciju analīze	Multipleksās <i>PCR</i>
	Gēna <i>CFTR</i> poli-T un poli-TG polimorfisma analīze	DNS sekvenēšana

### *DNS izdalīšana*

Y hromosomas mikrodēlēciju skrīningam DNS tika iegūta no pētījumā izmantoto neauglīgo vīriešu perifēro asins paraugiem ar Nucleon BACC1 komerciālo komplektu (Amersham, USA). Savukārt DNS no kontroles grupu pārstāvju asins paraugiem bija izdalīta ar fenola-hloroforma metodi (un uzglabāta RSU Molekulārās ģenētikas zinātniskās laboratorijas kolekcijā).

### ***Y hromosomas mikrodelēciju analīze***

Y hromosomas mikrodelēcijas tika noteiktas ar polimerāzes ķēdes reakcijas (*polymerase chain reaction, PCR*) palīdzību, kuras gaitā tika pavairoti noteikti specifiski Y hromosomas reģioni (*sequence target sites, STS*). Katra PCR tika veikta multipleksā PCR formā. Analīzē izmantotas šādas kontroles: PCR iekšējās kontroles (*SRY* un *ZFX/ZFY* gēns), ārējā pozitīvā kontrole (vesela vīrieša DNS paraugs) un negatīvā kontrole (ūdens). Šo metodi Eiropas Androloģijas akadēmija ir atzinusi par “zelta standartu” Y mikrodelēciju diagnosticēšanā (Simoni et al., 2004). Lai veiktu Y hromosomas mikrodelēciju noteikšanas metožu salīdzinājumu, neauglīgo vīriešu DNS paraugi, kuros novērotas mikrodelēcijas, tika papildus analizēti ar “Promega 2.0” komerciālo komplektu.

### ***Y hromosomas haplogrupu analīze***

Y hromosomas haplogrupu noteikšanai neauglīgo vīriešu DNS paraugos tika lietoti seši bialēliskie marķieri (M9, SRY1532, M17, Tat, P21, M170), kuri tika izvēlēti, pamatojoties uz literatūras datiem par Eiropas populācijās raksturīgajām Y hromosomas haplogrupām (*Y Chromosome Consortium* 2002; Karafet et al., 2008), kā arī iepriekšējo pieredzi, veicot Y haplogrupu analīzi Latvijas populācijā. Šajā pētījumā tika noteiktas neauglīgo vīriešu populācijai raksturīgās Y hromosomas haplogrupas, izmantojot PCR, restrikcijas fragmentu garuma polimorfisma (*RFLP*) un DNS sekvenēšanas metodi.

### ***Y hromosomas haplotipu analīze***

Lai noteiktu Y hromosomas haplotipus jeb mikrosatelītu (*Y-STR, DYS*) alēļu variantus, tika analizēti 12 *Y-STRs* (*Promega, ASV*). Sagatavotie MSY rajona 12 *Y-STRs* produkti tika analizēti ar ABI PRISM 310 ģenētisko analizatoru (*Applied Biosystems, ASV*), izmantojot praimeru pārus, kuros tiešā praimera 5' gals iezīmēts ar vienu no četrām fluorescējošām iezīmēm. Iegūtie rezultāti tiek apskatīti un analizēti ar programmu *Genotyper 3.7* (*Applied Biosystems, ASV*) un *PowerTyper TM YMacro* (*Promega, ASV*), nosakot katra mikrosatelīta alēles garumu. Pacientu Y hromosomas mikrosatelītu dati tika izmantoti, lai noskaidrotu to piederību noteiktām Y hromosomas haplogrupām, izmantojot datorprogrammu (<http://www.hprg.com/hapest5>; Athey, 2005; Athey, 2006).



### ***Gēna CFTR mutāciju delF508 un R117H noteikšana***

Mutācija delF508 gēnā *CFTR* nosaka ar heterodupleksu *PCR* analīzi (Rommens et al, 1990). Mutācija R117H gēnā *CFTR* tika noteikta ar *PCR* un tai sekojošu restrikcijas fragmentu garuma polimorfisma (*RFLP*) analīzi (Boucher et al, 1999).

### ***Gēna CFTR poli-T un poli-TG polimorfismu analīze***

Gēna *CFTR* 8. intronam raksturīgās timīna nukleotīdu poli-T sekvences un TG dinukleotīda atkārtojumu poli-TG polimorfismi tika analizēti ar *PCR* (Chillon et al., 1995) un tai sekojošu *PCR* produktu sekvenēšanu (sekvenēšanas piceja izstrādāta šī darba ietvaros).

### ***Datu statistiskā apstrāde***

**$\chi^2$  analīze.** Lai noteiktu atšķirības Y hromosomas haplogrupu un gēna *CFTR* poli-T un poli-TG alēļu variantu sastopamības biežumā Latvijas populācijas neauglīgo vīriešu un kontroles grupās, tika izmantota  $\chi^2$  analīze. Visi *p* lielumi balstīti uz divu paraugkopu salīdzinājumu, un  $p < 0,05$  norāda statistiski ticamus rezultātus. Analīze tika veikta, izmantojot interaktīvo kalkulatoru (datorprogrammu), kas pieejama <http://www.quantpsy.org> (Preacher, 2001). Multiplu salīdzinājumu (Y hromosomas haplogrupu analīze; Hg N3a1, Hg R1a1 un Hg I) korekcijai  $\chi^2$  analīzē, lai mazinātu statistiskās  $\alpha$  kļūdas iespējamību, tika veikta korekcija ar Bonferroni (*Bonferroni*) testu (Bland and Altman, 1995). Pēc Bonferroni korekcijas Hg N3a1, Hg R1a1 haplogrupu gadījumā *p* vērtība ir statistiski ticama, ja  $p < 0,016$ , bet Hg I gadījumā, ja  $p < 0,025$ .

**Konfidences intervāla analīze (*Confidence Interval Analysis, CIA*).** Lai noteiktu atšķirības gēna *CFTR* polimorfisma variantu (poli-T, poli-TG un poli-T/TG) sastopamības biežumā neauglīgu vīriešu un kontroles grupās, tika izmantota *CIA* metode (Newcombe & Altman, 2000). Konfidences intervāla analīze tika veikta, izmantojot statistiskās analīzes datorprogrammu *CIA* (*Confidence Interval Analysis; proportions and their differences, 95% confidence interval for the difference, Newcombe method*). Visi *p* lielumi balstīti uz divu paraugkopu salīdzinājumu (neauglīgi vīrieši/kontroles grupa; neauglīgi vīrieši/CF slimnieki; kontroles grupa/CF slimnieki), un  $p < 0,05$  norāda statistiski ticamus rezultātus.

## Rezultāti

### 1. Y hromosomas mikrodelēcijas neauglīgiem vīriešiem

Multipleksā *PCR* analīze, analizējot Y hromosomas mikrodelēcijas dotajos paraugos, visos gadījumos deva neapšaubāmus rezultātus – abās multipleksās A un B polimerāzes ķēdes reakcijās netika novērota negatīvo kontroļu kontaminācija un abas pozitīvās kontroles, gan ar sievietes DNS (*PCR* iekšējā kontrole), gan auglīga vīrieša DNS (vīrieša DNS pozitīvā kontrole), vienmēr deva pozitīvus signālus.

Y hromosomas mikrodelēciju biežums analizētajā Latvijas neauglīgo vīriešu populācijā ir 5% (5 paraugos no 100). Trīs gadījumos no pieciem delēcija novērota AZFc rajonā, savukārt divos gadījumos atklāta visu AZF rajonu – AZFa, AZFb un AZFc – delēcija. Dati par Y hromosomas mikrodelēciju veidiem apkopoti 1. attēlā un 2. tabulā.

Visos gadījumos mikrodelēcijas tika atklātas neauglīgiem pacientiem ar smagu neauglības formu – azoospermiju vai oligozoospermiju. Neauglīgiem vīriešiem, kuru Y hromosomas garajā plecā atrasta delēcija AZFc rajonā (trīs gadījumi), spermatozoīdu skaits spermatogrammās ir atšķirīgs – vienā gadījumā spermatozoīdi netika novēroti (azoospermija), bet divos gadījumos atrada 1 – 5 nekustīgus spermatozoīdus (smaga oligozoospermija). Savukārt indivīdiem ar pilnu AZF rajonu (AZFa, AZFb, AZFc) delēciju (divi gadījumi) spermatogrammu dati parāda azoospermijas fenotipu. Abām personām ar pilnu visu trīs rajonu delēciju citoģenētiskā analīze parādīja anomāliju kariotipā, respektīvi, Y hromosomas garā pleca delēciju - 46,X,del(Y)(q). Vienai personai ar visu AZF rajonu delēciju kariotipa analīzē tika novērots ļoti neliels Y hromosomas garais plecs ar aizdomām par īsā pleca izohromosomu, kas netika apstiprināta ar šajā pētījumā izmantotajām metodēm (Y hromosomas mikrodelēciju un Y hromosomas mikrosatelītu analīze). Šim indivīdam klīniskās izmeklēšanas gaitā atklāta centrālā tipa aptaukošanās un īss kakls. Neauglības ilgums trīs gadi (2. tabula).

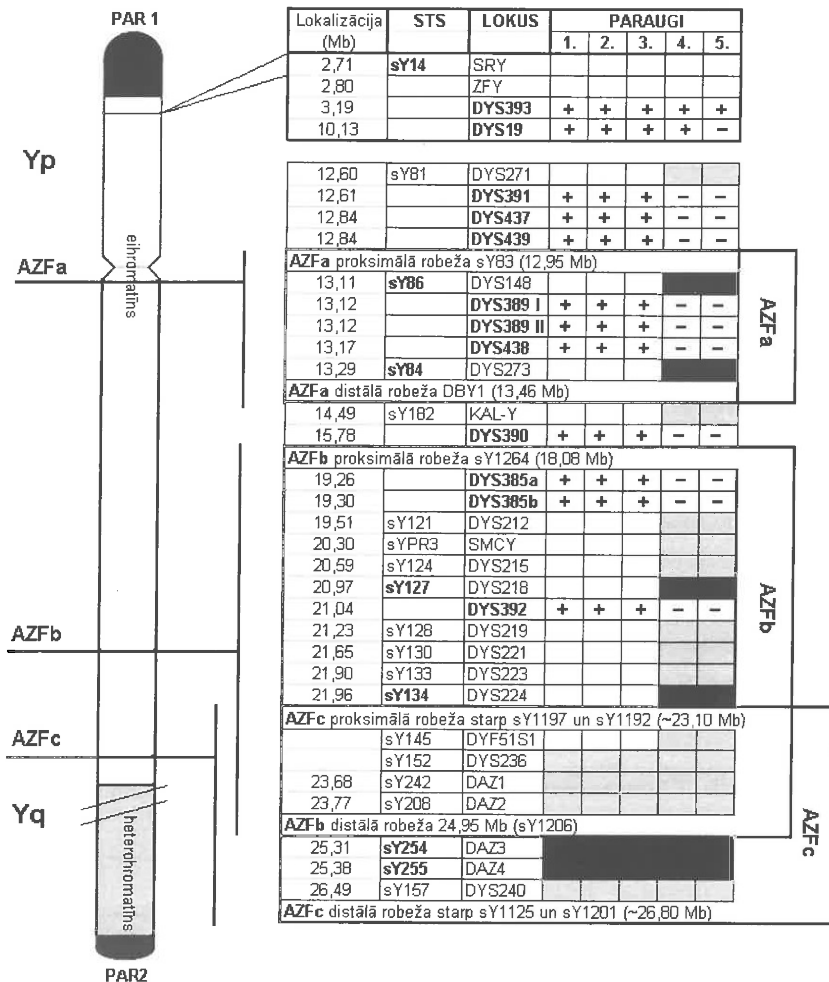
Analizējot 15 cistiskās fibrozes slimnieku DNS paraugus, Y hromosomas mikrodelēciju klātbūtne šajos paraugos netika apstiprināta.

Lai veiktu divu Y hromosomas mikrodelēciju metožu salīdzinājumu, pacientu DNS paraugi, kuros novērotas mikrodelēcijas, tika atkārtoti analizēti ar komerciālo kitu (Promega 2.0.). Iegūtie rezultāti apkopoti 1. attēlā (pelēkās rūtīņas). Šī analīze

apstiprina delēcijas *STS* (*sequence target sites*) rajonos, kuri tika analizēti ar multiplekso A un B *PCR* metodi (1. attēls, *STS* iezīmēti trekniem burtiem) un parādīja delēcijas citos *STS*, kas izklidēti pa visiem trim AZF rajoniem. Komerciālā kita dati parāda to pašu, ko multipleksās *PCR* reakcijas – trim no pieciem paraugiem ar mikrodelēcijām Y hromosomā delēcijas lokalizētas AZFc rajonā, pārējiem diviem deletēts viss AZF reģions, respektīvi, mikrodelēcijas skārušas gan AZFa, gan AZFb, gan AZFc rajonus.

2. tabula. Genotipu un fenotipu asociācija vīriešiem ar Y hromosomas mikrodelēcijām

Nr.	Deletētais rajons	Spermatozoīdu skaits spermatoogrammā	Klīniskā diagnoze	Kariotips	Fenotipiskie dati
1.	AZFc	0	azoospermija	46,XY	centrālā tipa aptaukošanās, ginekomastija, brahidaktīlija
2.	AZFc	5 mazkustīgi	smaga oligozoospermija	46,XY	epidēmiskais parotīts bērnībā, sēklinieku biopsijā atrod spermatīdas
3.	AZFc	1 – 2 nekustīgi	smaga oligozoospermija	46,XY	epidēmiskais parotīts bērnībā
4.	AZFa, AZFb, AZFc	0	azoospermija	46,X, del (Y)(q)	centrālā tipa aptaukošanās, ginekomastija, mazs labās puses sēklinieks
5.	AZFa, AZFb, AZFc	0	azoospermija	46,X, del (Y)(q)	datu nav



### 1. attēls. Y hromosmas mikrodelēciju analīzes dati pieciem pacientiem, kuros noteikta delēciju klātbūne

AZF rajoni parādīti attēla sānos, Y hromosmas specifisko marķieru (*sequence target sites* – STS; mikrosatelīti – Y-STR jeb DYS) lokalizācija atzīmēta attēla vidū. Melnās rūtiņas – attiecīgā AZF rajona/lokusa delēcija (multipleksā A un B PCR rezultāti). Trešiem burtiem atzīmēti tie STS, kas izmantoti multipleksajās PCR. Pelēkās rūtiņas – attiecīgā AZF rajona/lokusa delēcija (komerciālā kita rezultāti). Plus (+): Y-STR ir paraugā; mīnuss (-): Y-STR nav paraugā. PAR1 un PAR2 – Y hromosmas psidoautosomālie rajoni.

## 2. Y hromosomas haplogrupas neaugļiem vīriešiem

Lai noteiktu neauglību predisponējošas Y hromosomas haplogrupas, tika analizēti 79 vīriešu ar idiopātisku neauglību DNS paraugi. No 79 izanalizētajiem DNS paraugiem 56 saturēja makrohaplogrupas M9 G alēles variantu, un, izmantojot attiecīgos bialēliskos marķierus, šī Y hromosomas līnija tika sīkāk grupēta K klasterī (K\*), kas attiecīgi sadalījās N3a1 haplogrupā (Hg N3a1; marķieri Tat un P21) un R1a1 haplogrupā (Hg R1a1; marķieri SRY1532 un M17). M9 C alēles variants tika noteikts 23 (HgI un citas M9-C) gadījumos no 79 analizētajiem pacientu DNS paraugiem. Dotie paraugi atbilda F klasterim (F\*). Šajā paraugu grupā haplogrupa tika atrasta tikai diviem paraugiem, kas attiecīgi atbilda I haplogrupai (Hg I; marķieris M170). Diemžēl 21 paraugs neiekļāvās nevienā no analizētajām haplogrupām, līdz ar to šie paraugi pārstāv citas haplogrupas (M9-C; DE\* un F\*: G, J) (3. tabula). Līdz ar to būtu nepieciešami tālāki pētījumi, taču tas netraucēs saprast galvenās tendences, kas vērojamas “neauglības haplogrupu” pētījumos.

Lai būtu iespējams spriest par Y hromosomas haplogrupu saistību ar vīrieša neauglību, salīdzinājumam izmantoti Y hromosomas haplogrupu dati, kas iegūti veicot Y Hg analīzi etniskajiem latviešiem (vīrieši, trīs paaudzēs latvieši, kontroles grupa).

3. tabula. Y hromosomas haplogrupu sastopamība neauglīgu vīriešu un kontroles grupā

Haplogrupas (Hg)	Haplogrupu sastopamība (%)		P
	Neaugļi vīrieši n = 79	Kontroles grupa n = 153	
N3a1	24 (30,4%)	65 (42,5%)	0,223
R1a1	12 (15,2%)	60 (39,2%)	0,005
I	2 (2,5%)	13 (8,5%)	0,097
K* (bez N3 un R1a)	20 (25,3%)	10 (6,5%)	< 0,001
Citas (M9-C; DE* un F*: G, J)	21 (26,6%)	5 (3,3%)	< 0,001

Četras galvenās haplogrupas: N3a1, R1a1, K\* (bez N3 un R1a) un I gan neauglīgo vīriešu, gan kontroles grupā veido ~ 90% no visa latviešu Y hromosomas

genofonda un ir dominējošās haplogrupas Eiropas ziemeļaustrumu daļā. Šo haplogrupu sadalījums dažādās Eiropas populācijās un arī abās analizētajās grupās norāda uz to kopīgo pirmsvēsturi un izcelšanos.

Biežāk sastopamā haplogrupa analizēto neauglīgo vīriešu grupā ir N3a1, kas pārstāv 30,4% no visiem analizētajiem paraugiem (24 paraugi no 79). Savukārt tās biežums kontrolgrupas pārstāvjiem ir 42,5%. Šī haplogrupa ir pārstāvēta abās analizētajās grupās, un, veicot datu statistisko analīzi ( $\chi^2$  analīze), netika parādīta Hg N3a1 saistība ar vīriešu neauglību ( $p=0,223$ ).

Otra biežāk sastopamā Y hromosomas haplogrupa gan kontroles, gan neauglīgo vīriešu grupā ir Hg R1a1. Salīdzinot R1a1 haplogrupas biežumu abās grupās tika noskaidrots, ka Hg R1a1 ir mazāk atrodama neauglīgo vīriešu DNS paraugos (15,2%, jeb 12 paraugi no 79), taču kontroles grupā tās biežums ir 39,2%. Veicot  $\chi^2$  analīzi, tika noteikta ticamības  $p$  vērtība, kas bija 0,005, un tā parāda, ka R1a1 haplogrupa varētu būt vairāk raksturīga vīriešiem bez spermatogēnēzes traucējumiem, nekā analizētajiem neauglīgajiem vīriešiem.

Y hromosomas I haplogrupa tika pārstāvēta 2,5% (2 paraugi no 79) neauglīgu vīriešu vidū, savukārt kontroles grupā 8,5% (13 gadījumi no 153). Arī šīs abas grupas tika salīdzinātas savā starpā, veicot  $\chi^2$  analīzi, un tika noskaidrots, ka  $p = 0,097$ . Tātad I haplogrupa neparāda saistību ar vīriešu neauglību.

Pētījumā tika noteikts, ka haplogrupa K\* sastopama 25,3% neauglīgu vīriešu Y hromosomās (20 paraugi no 79). Taču kontroles grupā šīs haplogrupas sastopamība ir daudz mazāka – attiecīgi tikai 6,5%. Veicot  $\chi^2$  analīzi, tika noteikta ticamības  $p$  vērtība, kas bija  $< 0,001$ , un tā parāda, ka K\* klasteris vairāk raksturīgs analizēto neauglīgo vīriešu Y hromosomas līnijām.

## **2.1. Y hromosomas haplotipu analīze neauglīgiem vīriešiem ar Y hromosomas mikrodelēcijām**

Y hromosomas mikrosatelītu (*Y-STR* jeb *DYS*) genotipēšanas metode tika izmantota šajā pētījumā, lai saprastu Y hromosomas haplotipus (alēļu/gēnu vai polimorfismu grupa, kas iedzimst pilnīgi saistīti; haplotipi veido haplogrupas) pacientiem, kuriem novērotas Y mikrodelēcijas. Šī metode atkārtoti apstiprināja Y hromosomas mikrodelēcijas, jo pacientiem ar šīm mikrodelēcijām attiecīgajos Y hromosomas rajonos netika konstatēti noteikti Y hromosomas mikrosatelīti.



*Y-STR* genotipēšanas rezultāti ir apkopoti 1. attēlā un 4. tabulā. DNS paraugi ar AZFc mikrodelēcijām (nr. 1. – 3.) parāda dažādu *Y-STR* ainu un dažādu attiecīgo mikrosatelītu atkārtojumu skaitu.

4. tabula. Mikrosatelītu dati pacientiem ar Y hromosomas mikrodelēcijām

Nr.	Mikrodelēcijas veids	Y hromosomas haplotips ( <i>Y-STR</i> haplotips)											Y H <sub>g</sub>	
		DYS 393	DYS 19	DYS 391	DYS 437	DYS 439	DYS 389I	DYS 389II	DYS 438	DYS 390	DYS 385a	DYS 385b		DYS 392
1.	AZFc	14	15	11	13	9	13	29	10	23	11	14	13	N3a1
2.	AZFc	14	15	11	13	10	13	29	10	23	11	14	13	N3a1
3.	AZFc	14	15	10	13	10	14	30	10	23	11	14	13	K* (N)
4.	AZFa,b,c	14	15	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	M9-C (F*)
5.	AZFa,b,c	13	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	K* (R1b)

AZFc, AZFa,b,c – mikrodelēcijas AZF rajonos

*DYS* – mikrosatelītu apzīmējums (*Y-STR*)

Skaitļi – mikrosatelītu atkārtojumu skaits

Mīnuss (-) – mikrosatelīts nav atrasts

Tā kā visi komerciālajā komplektā pieejamie *Y-STR* lokalizēti pa visu Y hromosomu, izņemot AZFc rajonu, tad iegūtie rezultāti nedod papildu informāciju par indivīdiem, kuru Y hromosomās atrasts tieši šis mikrodelēciju veids. Savukārt abu neauglīgo vīriešu paraugos (paraugi nr.4 un nr.5) ar visu trīs AZF rajonu delēciju *Y-STR* genotipēšanas dati parāda tikai divu mikrosatelītu *DYS393* un *DYS19* klātbūtni. Abi mikrosatelīti atrodas Y hromosomas īsajā plecā (1. attēls). Taču paraugs nr.5 atšķiras no parauga nr.4, jo tam trūkst *DYS19* mikrosatelīta. Iegūtie dati parāda, ka, nosakot mikrosatelītu iztrūkumu Y hromosomas garajā plecā, tiek apstiprināts, ka analizēto paraugu DNS ir notikušas delēcijas attiecīgajos AZF rajonos un ārpus tiem.

Y hromosomas mikrosatelītu dati tika izmantoti, lai noskaidrotu to piederību noteiktām Y hromosomas haplogrupām (izmantojot datorprogrammu <http://www.hprg.com/hapest5/>). *Y-STR* analīzes dati papildina un dažos gadījumos precizē neauglīgo vīriešu DNS paraugu piederību noteiktai Y hromosomas haplogrupai. Piemēram, ar bialēlisko marķieru palīdzību tika noskaidrots, ka paraugs nr.3 pieder M9-G makrohaplogrupai (K klasteris), bet tā piederību apakšhaplogrupai noteikt nebija iespējams. Savukārt mikrosatelītu analīze deva precizējumu par parauga nr.3 piederību N haplogrupai.

### 3. Gēna *CFTR* molekulārā izpēte

#### 3.1. Gēna *CFTR* mutāciju delF508 un R117H analīze

Nosakot gēna *CFTR* delF508 un R117H mutāciju klātbūtni 82 neauglīgu vīriešu DNS paraugos, šīs mutācijas netika atklātas.

#### 3.2. Gēna *CFTR* 8. introna poli-T un poli-TG polimorfismu noteikšana

Rezultāti, kas iegūti pētījumā, apkopoti 5. – 10. tabulā.

##### Gēna *CFTR* poli-T polimorfisms

Gēna *CFTR* poli-T secības (poli-T trakts) 5T variants neauglīgo vīriešu grupā bija satopams 3 gadījumos no analizētajām 164 alēlēm, kas atbilst 2%, 9T variants bija novērojams 19 alēlēs jeb 12% gadījumu. Neauglīgu vīriešu DNS paraugos visbiežāk pārstāvētais poli-T variants bija 7T alēle, kas atbilst 87% no analizētajām alēlēm. Salīdzinot poli-T trakta alēļu un genotipu sastopamību analizētajos paraugos, tika noskaidrots, kuri alēļu un genotipu varianti parāda statistiski ticamas atšķirības analizētajās paraugu grupās (5. un 6. tabula).

5. tabula. Poli-T trakta alēļu polimorfisms

Poli-T trakta alēle	Neauglīgi vīrieši n=164 (%)	Kontroles grupa n=120 (%)	CF pacienti n=30 (%)
9T	19 (12%) <sup>a</sup>	18 (15%) <sup>a</sup>	21 (70%) <sup>a,b</sup>
7T	142 (87%) <sup>c</sup>	92 (77%) <sup>d</sup>	8 (27%) <sup>c,d</sup>
5T	3 (2%)	10 (8%) <sup>e</sup>	1 (3%) <sup>e</sup>

<sup>a</sup> statistiski ticamas atšķirības, salīdzinot 9T alēles biežumu CF slimnieku un neauglīgu vīriešu paraugos (95% ticamības intervāls CI=0.396-0.723;  $\chi^2= 24.559$ ,  $p<0.001$ )

<sup>b</sup> statistiski ticamas atšķirības, salīdzinot 9T alēles biežumu CF slimnieku un kontroles grupas paraugos (95% CI=0.356-0.693;  $\chi^2= 16.320$ ,  $p<0.001$ )

<sup>c</sup> statistiski ticamas atšķirības, salīdzinot 7T alēles biežumu neauglīgu vīriešu un CF slimnieku paraugos (95% CI=0.411-0.732;  $\chi^2= 7.834$ ,  $p=0.005$ )

<sup>d</sup> statistiski ticamas atšķirības, salīdzinot 7T alēles biežumu kontroles grupas un CF slimnieku paraugos (95% CI=0.304-0.642;  $\chi^2= 5.804$ ,  $p=0.016$ )

<sup>e</sup> statistiski ticamas atšķirības, salīdzinot 5T alēles biežumu kontroles grupas un neauglīgu vīriešu paraugos (95% CI=0.014-0.129;  $\chi^2= 4.744$ ,  $p=0.029$ )

Poli-T trakta 9 T alēle ir biežāk sastopama CF pacientiem, salīdzinot ar neauglīgo vīriešu un kontroles grupas paraugiem ( $p<0,001$ ). Savukārt 7T alēle, kas ir



visbiežākais poli-T variants neauglīgo vīriešu DNS paraugos, neparāda statistiski ticamas atšķirības, salīdzinot šīs alēles biežumu ar kontroles grupu. Tomēr jāatzīmē, ka 7T alēle mazāk sastopama CF pacientu grupā, salīdzinot ar neauglīgo vīriešu un kontroles grupas ( $p < 0,01$ ) DNS paraugiem. Poli-T trakta 5T alēle, kas pēc literatūras datiem (Chillon et al., 1995) biežāk sastopama *CBAVD* (iedzimts *vas deferens* trūkums, *congenital bilateral absence of the vas deferens*) gadījumā, šajā pētījumā vairāk pārstāvēta kontroles grupas paraugos, salīdzinot ar šīs alēles biežumu neauglīgajiem vīriešiem ( $p = 0,029$ ). Salīdzinot 5T alēles frekvenci kontroles grupas un CF slimnieku paraugos, statistiski ticamas atšķirības netika novērotas.

6. tabula. Poli-T trakta **genotipu** polimorfisms

Poli-T trakta genotips	Neauglīgi vīrieši n=82 (%)	Kontroles grupa n=60 (%)	CF pacienti n=15 (%)
<b>9T/9T</b>	2 (2%) <sup>a</sup>	2 (3%) <sup>b</sup>	9 (60%) <sup>a b</sup>
<b>7T/7T</b>	62 (76%) <sup>c</sup>	37 (62%) <sup>d</sup>	2 (13%) <sup>c d</sup>
<b>5T/5T</b>	nav	3 (5%)	nav
<b>9T/7T</b>	15 (18%)	14 (23%)	3 (20%)
<b>5T/7T</b>	3 (4%)	4 (7%)	1 (7%)

<sup>a</sup> statistiski ticamas atšķirības, salīdzinot 9T/9T genotipa biežumu CF pacientu un neauglīgu vīriešu paraugos (95% CI=0.326-0.778;  $\chi^2 = 21.475$ ,  $p < 0.001$ )

<sup>b</sup> statistiski ticamas atšķirības, salīdzinot 9T/9T genotipa biežumu CF pacientu un kontroles grupas paraugos (95% CI=0.311-0.770;  $\chi^2 = 15.278$ ,  $p < 0.001$ )

<sup>c</sup> statistiski ticamas atšķirības, salīdzinot 7T/7T genotipa biežumu neauglīgu vīriešu un CF pacientu paraugos (95% CI=0.357-0.748;  $\chi^2 = 4.978$ ,  $p = 0.026$ )

<sup>d</sup> statistiski ticamas atšķirības, salīdzinot 7T/7T genotipa biežumu kontroles grupas un CF pacientu paraugos (95% CI=0.052-0.462;  $\chi^2 = 4.472$ ,  $p = 0.034$ )

Tā kā 9T alēle, kā iepriekš minēts, ir biežāk sastopama CF pacientiem, tad attiecīgi 9T/9T genotips ir visbiežāk pārstāvēts tieši CF slimnieku paraugos, salīdzinot ar neauglīgo vīriešu ( $p < 0,001$ ) un kontroles grupas ( $p < 0,001$ ) paraugiem. Līdzīgi dati iegūti arī 7T/7T genotipa gadījumā, jo, pateicoties 7T alēles augstajai izplatībai neauglīgo vīriešu un kontroles grupas hromosomās, 7T/7T genotips vismazāk pārstāvēts CF pacientu grupā, salīdzinot ar neauglīgo vīriešu ( $p = 0,026$ ) un kontroles grupas ( $p = 0,034$ ) paraugiem. Pārējie genotipi (5T/5T, 9T/7T, 5T/7T), kas tika novēroti analizētajos paraugos, neuzrādīja statistiski ticamas atšķirības starp parauggrupām.

### ***Gēna CFTR poli-TG polimorfisms***

Neauglīgo vīriešu DNS paraugos gēna *CFTR* 8. introna poli-TG secību (poli-TG trakts) var veidot šādas alēles: 12TG, 11TG, 10TG un 9TG. Biežāk sastopamais TG dinukleotīdu atkārtojumu variants ir 11TG, kas veido 52% no analizētajām alēlēm (86 no 164 alēlēm). Otrs biežāk sastopamais TG polimorfisms ir 10TG, kas atrodams 59 alēlēs un kas atbilst 36% analizēto paraugu. Dinukleotīdu atkārtojumi 12TG un 9TG sastopami daudz retāk, respektīvi, 15 alēlēm raksturīgs 12TG variants (9%), bet tikai 4 alēles ir sastopamas 9TG formā (2%) (7. tabula).

Salīdzinot poli-TG trakta alēļu un genotipu sastopamību analizētajos paraugos, tika noskaidrots, kuri alēļu un genotipu varianti parāda statistiski ticamas atšķirības analizētajās paraugu grupās (7. un 8. tabula).

7. tabula. Poli-TG trakta alēļu polimorfisms

Poli-TG trakta alēle	Neauglīgi vīrieši n=164 (%)	Kontroles grupa n=120 (%)	CF pacienti n=30 (%)
12TG	15 (9%)	18 (15%)	1 (3%)
11TG	86 (52%) <sup>a</sup>	52 (43%) <sup>b</sup>	4 (13%) <sup>a,b</sup>
10TG	59 (36%)	48 (40%)	15 (50%)
9TG	4 (2%) <sup>c</sup>	2 (2%) <sup>d</sup>	8 (27%) <sup>c,d</sup>
8TG	nav	nav	1 (3%)
7TG	nav	nav	1 (3%)

<sup>a</sup> statistiski ticamas atšķirības, salīdzinot 11TG alēles biežumu neauglīgu vīriešu un CF pacientu paraugos (CI=0.211-0.501;  $\chi^2=6.077$ ,  $p=0.014$ )

<sup>b</sup> statistiski ticamas atšķirības, salīdzinot 11TG alēles biežumu kontroles grupas un CF pacientu paraugos (95% CI=0.116-0.420;  $\chi^2=4.003$ ,  $p=0.045$ )

<sup>c</sup> statistiski ticamas atšķirības, salīdzinot 9TG alēles biežumu CF pacientu un neauglīgu vīriešu paraugos (95% CI=0.112-0.421;  $\chi^2=16.438$ ,  $p<0.001$ )

<sup>d</sup> statistiski ticamas atšķirības, salīdzinot 9TG alēles biežumu CF pacientu un kontroles grupas paraugos (95% CI=0.118-0.428;  $\chi^2=15.471$ ,  $p<0.001$ )

Poli-TG trakta alēle 11 TG vairāk sastopama neauglīgo vīriešu ( $p=0,014$ ) un kontroles grupas ( $p=0,045$ ) paraugos, salīdzinot ar CF pacientu paraugkopu. Salīdzinot neauglīgo vīriešu un kontroles grupas gēna *CFTR* poli-TG polimorfisma 11TG variantu, statistiski ticamas atšķirības netika novērotas. Savukārt 9TG alēle, kas atbilst vienam no īsākajiem TG dinukleotīda atkārtojumiem, vairāk pārstāvēta CF pacientu paraugos, salīdzinot ar neauglīgo vīriešu ( $p<0.001$ ) un kontroles grupas ( $p<0.001$ ) paraugiem. Pārējām TG alēlēm (12TG, 10TG), kuras novēro visās analizētajās

parauggrupās, statistiski ticamas atšķirības starp analizētajiem paraugiem netika novērotas.

8. tabula. Poli-TG trakta genotipu polimorfisms

Poli-TG trakta genotips	Neauglīgi vīrieši n=82 (%)	Etniskie vīrieši n=60 (%)	CF vīrieši n=15 (%)
12TG/12TG	2 (2%)	nav	nav
11TG/11TG	18 (22%)	12 (20%)	0
10TG/10TG	8 (10%) <sup>a</sup>	7 (12%) <sup>b</sup>	6 (40%) <sup>a b</sup>
9TG/9TG	nav	nav	3 (20%)
12TG/11TG	8 (10%)	6 (10%)	1 (7%)
12TG/10TG	3 (4%) <sup>c</sup>	12 (20%) <sup>c</sup>	0
11TG/10TG	39 (48%)	21 (35%)	2 (13%)
11TG/9TG	3 (4%)	1 (2%)	1 (7%)
10TG/9TG	1 (1%)	1 (2%)	1 (7%)
8TG/7TG	nav	nav	1 (7%)

<sup>a</sup> statistiski ticamas atšķirības, salīdzinot 10TG/10TG genotipa biežumu CF vīriešu un neauglīgu vīriešu paraugos (95% CI=0.084-0.550;  $\chi^2=4.332$ , p=0.037)

<sup>b</sup> statistiski ticamas atšķirības, salīdzinot 10TG/10TG genotipa biežumu CF vīriešu un etnisku vīriešu paraugos (95% CI=0.056-0.533;  $\chi^2=4.171$ , p=0.041)

<sup>c</sup> statistiski ticamas atšķirības, salīdzinot 12TG/10TG genotipa biežumu etnisku vīriešu un neauglīgu vīriešu paraugos (95% CI=0.059-0.284;  $\chi^2=6.339$ , p=0.012)

Salīdzinot poli-TG trakta TG genotipus analizētajās paraugu grupās, statistiski ticamas atšķirības tika novērotas 10TG/10TG un 12TG/10TG genotipu variantiem. Genotips 10TG/10TG vairāk sastopams CF pacientiem, salīdzinot ar neauglīgo vīriešu (p=0,037) un kontroles grupas (p=0,041) paraugiem. Turklāt 12TG/10TG genotips ir dominējošais variants kontroles grupas hromosomās, salīdzinot ar neauglīgo vīriešu grupu (p=0,012). Savukārt 12TG/10TG genotipa klātbūtne CF pacientu paraugos nav novērota. Analizējot 11TG/10TG genotipu biežumu visās trijās paraugu grupās ar statistiskās analīzes datorprogrammu *CIA* (ticamības intervāla analīze, *Confidence Interval Analysis*; proportions and their differences 95% confidence interval for the difference, Newcombe method) tika apstiprināts, ka 11TG/10TG genotips ir biežāk sastopams neauglīgiem vīriešiem, salīdzinot ar kontroles grupu (95% CI=0.075-0.489). Taču veicot  $\chi^2$  analīzi, statistiski ticami dati, salīdzinot šī genotipa varianta izplatību abās minētajās paraugu grupās, netika iegūti ( $\chi^2=0.647$ , p=0.421). Iegūtie rezultāti liecina par to, ka 11TG/10TG genotips ir biežāk sastopams neauglīgiem vīriešiem nekā kontroles grupā, taču nav iespējams apgalvot, ka šie dati ir neapšaubāmi statistiski ticami, jo viena metode parāda statistiski ticamas atšķirības,

bet otra ne. Pārējie TG genotipi, kas pārstāvēti visās paraugkopās, sastopami vienlīdz bieži vai arī ir unikāli kādai no grupām (skatīt 8. tabulu) un statistiski ticamas atšķirības neparādīja.

### **Gēna CFTR poli-T un poli-TG trakta polimorfisms (T/TG haplotipi)**

Nosakot poli-T un poli-TG polimorfismu gēna CFTR 8. intronā 82 neauglīgu vīriešu hromosomās, tika iegūti šādi rezultāti: analizētie DNS paraugi izveido astoņus dažādus poli-TG dinukleotīda atkātojumumu un poli-T trakta haplotipus (T/TG haplotipi), respektīvi, 9T/11TG, 9T/10TG, 9T/9TG, 7T/12TG, 7T/11TG, 7T/10TG, 5T/12TG, un 5T/11TG (9. tabula).

Salīdzinot poli-T un poli-TG trakta alēļu un genotipu sastopamību analizētajos paraugos tika noskaidrots, kuri alēļu un genotipu varianti parāda statistiski ticamas atšķirības analizētajās paraugu grupās (9. un 10. tabula).

9. tabula. Poli-T un poli-TG trakta alēļu (T/TG haplotipu) polimorfisms

Poli-T un poli-TG trakta alēles	Neauglīgi vīrieši n=164 (%)	Kontroles grupa n=120 (%)	CF pacienti n=30 (%)
9T/11TG	3 (2%)	1 (1%)	1 (3%)
9T/10TG	12 (7%) <sup>a</sup>	15 (13%) <sup>b</sup>	12 (40%) <sup>a,b</sup>
9T/9TG	4 (2%) <sup>c</sup>	2 (2%) <sup>d</sup>	8 (27%) <sup>c,d</sup>
7T/12TG	14 (9%)	14 (12%)	1 (3%)
7T/11TG	81 (49%) <sup>e</sup>	45 (38%) <sup>f</sup>	3 (10%) <sup>e,f</sup>
7T/10TG	47 (29%)	33 (28%)	3 (10%)
7T/7TG	nav	nav	1 (3%)
5T/12TG	1 (1%) <sup>g</sup>	6 (5%) <sup>g</sup>	0
5T/11TG	2 (1%)	4 (3%)	0
5T/8TG	nav	nav	1 (3%)

<sup>a</sup> statistiski ticamas atšķirības, salīdzinot 9T/10TG alēles biežumu CF pacientu un neauglīgu vīriešu paraugos (CI=0.396-0.723;  $\chi^2=14.233$ ,  $p<0.001$ )

<sup>b</sup> statistiski ticamas atšķirības, salīdzinot 9T/10TG alēles biežumu CF pacientu un kontroles grupas paraugos (95% CI=0.356-0.693;  $\chi^2=6.264$ ,  $p=0.012$ )

<sup>c</sup> statistiski ticamas atšķirības, salīdzinot 9T/9TG alēles biežumu CF pacientu un neauglīgu vīriešu paraugos (95% CI=0.112-0.421;  $\chi^2=16.438$ ,  $p<0.001$ )

<sup>d</sup> statistiski ticamas atšķirības, salīdzinot 9T/9TG alēles biežumu CF pacientu un kontroles grupas paraugos (95% CI=0.118-0.428;  $\chi^2=15.471$ ,  $p<0.001$ )

<sup>e</sup> statistiski ticamas atšķirības, salīdzinot 7T/11TG alēles biežumu neauglīgu vīriešu un CF pacientu paraugos (95% CI=0.220-0.494;  $\chi^2=6.829$ ,  $p=0.009$ )

<sup>f</sup> statistiski ticamas atšķirības, salīdzinot 7T/11TG alēles biežumu kontroles grupas un CF pacientu paraugos (95% CI=0.099-0.386;  $\chi^2=4.01$ ,  $p=0.045$ )

<sup>g</sup> statistiski ticamas atšķirības, salīdzinot 5T/12TG alēles biežumu kontroles grupas un neauglīgu vīriešu paraugos (95% CI=0.005-0.099;  $\chi^2=3.635$ ,  $p=0.022$ )

10. tabula. Poli-T un poli-TG trakta **genotipu** (T/TG haplotipu) polimorfisms

Poli-T un poli-TG trakta genotipi *	Neauglīgi vīrieši n=82 (%)	Kontroles grupa n=60 (%)	CF pacienti n=15 (%)
9T/11TG; 9T/11TG	1 (1%)	nav	nav
9T/10TG; 9T/10TG	nav	nav	5 (33%)
9T/9TG; 9T/9TG	nav	nav	3 (20%)
7T/12TG; 7T/12TG	2 (2%)	nav	nav
7T/11TG; 7T/11TG	17 (21%)	10 (17%)	0
7T/10TG; 7T/10TG	8 (10%)	7 (12%)	1 (7%)
5T/11TG; 5T/11TG	nav	2 (3%)	nav
9T/11TG; 9T/10TG	1 (1%)	1 (2%)	0
9T/10TG; 9T/9TG	nav	1 (2%)	1 (7%)
9T/11TG; 7T/12TG	nav	nav	1 (7%)
9T/10TG; 7T/12TG	2 (2%)	6 (10%)	0
9T/10TG; 7T/11TG	9 (11%)	7 (12%)	1 (7%)
9T/9TG; 7T/11TG	3 (4%)	1 (2%)	1 (7%)
9T/9TG; 7T/10TG	1 (1%)	nav	nav
7T/12TG; 7T/11TG	8 (10%)	5 (8%)	0
7T/12TG; 7T/10TG	nav	3 (5%)	nav
7T/11TG; 7T/10TG	27 (33%)	12 (20%)	1 (7%)
5T/12TG; 7T/10TG	1 (1%)	3 (5%)	0
5T/11TG; 7T/10TG	2 (2%)	1 (2%)	0
5T/8TG; 7T/7TG	nav	nav	1 (7%)
5T/12TG; 5T/11TG	nav	1 (2%)	nav

\* statistiski ticamas atšķirības, salīdzinot poli-T un poli-TG genotipu variantus analizētajās parauggrupās netika novērotas

Biežākais haplotips starp neauglīgo vīriešu *CFTR* alēlēm ir 7T/11TG. Šis haplotips visretāk sastopams CF slimnieku paraugos, salīdzinot ar neauglīgo vīriešu ( $p=0,009$ ) un kontroles grupas ( $p=0,045$ ) paraugiem. Savukārt salīdzinot 7T/11TG haplotipu neauglīgo vīriešu un kontroles grupas paraugos, statistiski ticamas atšķirības novēroja, tikai veicot analīzi ar statistiskās analīzes datorprogrammu *CIA* (95% CI=0.002-0.230). Veicot  $\chi^2$  analīzi, statistiski ticami dati, salīdzinot šī haplotipa varianta izplatību abās minētajās paraugu grupās, netika iegūti ( $\chi^2=1.292$ ,  $p=0.256$ ). Iegūtie rezultāti liecina par to, ka 7T/11TG haplotips ir biežāk sastopams neauglīgiem vīriešiem nekā kontroles grupā, taču nav iespējams apgalvot, ka šie dati ir neapšaubāmi statistiski ticami, jo viena metode parāda statistiski ticamas atšķirības, bet otra ne. Līdzīga situācija novērojama arī 7T/10TG haplotipa gadījumā, kad salīdzina neauglīgo vīriešu paraugos ar CF pacientu grupu (pēc *CIA* statistiski ticamas atšķirības, 95% CI=0.018-0.285; pēc  $\chi^2$  analīzes dati neparāda statistiski ticamas atšķirības  $\chi^2=2.289$ ,  $p=0.130$ ), kā arī salīdzinot kontroles grupu (pēc *CIA* statistiski

ticamas atšķirības, 95% CI=0.003-0.283; pēc  $\chi^2$  analīzes dati neparāda statistiski ticamas atšķirības  $\chi^2=1.967$  P=0.161) ar CF vīriešu 7T/10TG haplotipa rezultātiem. Savukārt 9T/10TG (40%) un 9T/9TG (27%) ir biežākie haplotipi starp cistiskās fibrozes pacientu alēlēm. 9T/10TG haplotips ir biežāk sastopams CF slimniekiem, salīdzinot ar neauglīgo vīriešu ( $p<0,001$ ) un kontroles grupas ( $p<0,001$ ) paraugiem. Līdzīgi 9T/9TG haplotips ir biežāk sastopams CF pacientiem, salīdzinot ar neauglīgo vīriešu ( $p<0,001$ ) un kontroles grupas ( $p<0,001$ ) paraugiem. Savukārt neauglīgo vīriešu gēna *CFTR* haplotipu varianti īpaši neatšķiras no kontroles grupas *CFTR* haplotipiem, un statistiski ticamas atšķirības abās paraugu grupās nenovēroja, izņemot 5T/12TG haplotipu, kas biežāk sastopams kontroles grupā ( $p=0,022$ ). Pārējie T/TG haplotipi, kas pārstāvēti visās paraugkopās, sastopami vienlīdz bieži vai arī ir unikāli kādai no grupām (skatīt 9. un 10. tabulu) un statistiski ticamas atšķirības neparādīja. Analizējot poli-T un poli-TG trakta genotipus, statistiski ticamas atšķirības starp pētījumā aplūkotajām paraugu grupām netika novērotas (10. tabula).

Mūsu pētījumam līdzīga metodiskā pieeja un datu interpretācija parādīta itāliešu (Tamburino et al., 2008) un vācu pētījumā (Gallati et al., 2009). Vācu pētījums uzskatāmi parāda 5T/12TG un 5T/13TG alēļu saistību ar izmainītu spermatogēnēzi, kuras iemesls nav sēklas vada obstrukcija. Vācu pētījumā 5T/12TG un 5T/13TG haplotipus atrod tikai neauglīgo vīriešu DNS paraugos, savukārt mūsu iegūtie rezultāti un itāliešu pētījuma dati (Tamburino et al., 2008) šādu saistību neparāda.

### **3.3. Gēna *CFRT* poli-T un poli-TG polimorfismu analīze vīriešiem ar smagu neauglības formu**

Pamatojoties uz mūsu pētījumā iegūtajiem rezultātiem par gēna *CFRT* poli-T un poli-TG trakta alēļu un genotipu variantu savstarpējo līdzību (aprakstīts 3.2. nodaļā), tika veikta atsevišķu neauglīgo vīriešu DNS paraugu gēna *CFTR* polimorfisma datu analīze un meklēta saistība ar noteiktām neauglības formām. Lai veiktu šo uzdevumu, tika izvēlētas divas paraugkopas – azoospermijas (12 no 100 paraugiem) un oligozoospermijas (26 no 100 paraugiem) pacientu paraugi. Salīdzinot abu grupu gēna *CFTR* polimorfo alēļu T un TG biežumu un veicot statistisko datu apstrādi ( $\chi^2$  analīze), diemžēl neizdevās atrast statistiski ticamas atšķirības pēc poli-T un poli-TG variantu izplatības azoospermijas un oligozoospermijas gadījumā.

## Diskusija

### 1. Y mikrodelēciju noteikšanas metodes ieviešanas nepieciešamība Latvijā

Y hromosomas mikrodelēcijas ir otrs biežākais ģenētiskais spermatoģenēzes traucējumu iemesls vīriešu neauglībai pēc Klainfeltera sindroma (Simoni et al., 2004). Y hromosomas mikrodelēciju noteikšana ir rutīnas diagnostikas metode daudzās pasaules un Eiropas molekulārās ģenētikas vai androloģijas laboratorijās. Bez tam Eiropas andrologu akadēmija (*European Academy of Andrology, EAA*) un Eiropas molekulārās ģenētikas kvalitātes kontroles apvienība (*European Molecular Genetics Quality Network, EMQN*) atbalsta un sekmē Y hromosomas mikrodelēciju analīzes ieviešanu laboratorijās, publicējot rekomendācijas šīs analīzes veikšanai un organizējot ārējās kvalitātes pārbaudes. Tā kā Latvijā līdz šim Y hromosomu noteikšana netika piedāvāta kā diagnostikas metode, tad šī darba viens no galvenajiem uzdevumiem bija aprobēt un ieviest Latvijā šo precīzo un jutīgo analīzes metodi.

Kāpēc nepieciešams ieviest Y hromosomas mikrodelēciju analīzes metodi Latvijā? Pirmkārt, Y hromosomas mikrodelēcijas nav iespējams noteikt, balstoties uz citoģenētiskām (hromosomu krāsošanas un mikroskopiskas analīzes) metodēm, klīnisko anamnēzi vai spermas analīzi. Līdz ar to nepieciešamas molekulārās diagnostikas metodes, tādas kā polimerāzes ķēdes reakcija (*PCR*). Otrs aspekts nepieciešamībai ieviest šo metodi ir parādīt Eiropas kontekstā, ka arī Latvijā iespējams precīzi un kvalitatīvi veikt Y hromosomas mikrodelēciju analīzi. Y hromosomas mikrodelēciju diagnostikas precizitāte tika pārbaudīta 2009. gadā (A.Puzukas promocijas darba ietvaros), piedaloties *EMQN* organizētajā laboratoriju kvalitātes kontroles testēšanā. Rīgas Stradiņa universitātes Molekulārās ģenētikas laboratorijā anonīmiem *EMQN* atsūfītiem paraugiem ar nezināmu mikrodelēciju ainu tika pareizi noteikti genotipi – konkrētu *AZF* rajonu mikrodelēciju klātbūtne vai to trūkums, kā arī pacientam izveidota kvalitatīva atskaites forma, kurā precīzi atspoguļotas rekomendācijas attiecīgo mikrodelēciju gadījumā. Pēc *EMQN* speciālistu izvērtējuma RSU Molekulārās ģenētikas laboratorijā realizētā Y hromosomas mikrodelēciju diagnostikas un interpretācijas precizitāte tika novērtēta ar 2 punktiem (maksimālais punktu skaits par genotipa precīzu noteikšanu) un 1,67 punktiem par interpretāciju.

Kāpēc vajag atklāt Y hromosomas mikrodelēcijas? Tā kā līdz šim Y mikrodelēcijas Latvijā netika noteiktas, tad metodes ieviešana ļāva apzināt Y hromosomas mikrodelēciju biežumu vīriešiem ar idiopātisku neauglību. Darba ietvaros tika noteikts, ka mikrodelēciju biežums ir 5%. Šo aprobēto metodi iespējams piedāvāt kā rutīnas skrīninga metodi idiopātiskas vīriešu neauglības gadījumā, tādējādi daļai šo pacientu, ja mikrodelēciju klātbūtne tiktu apstiprināta, varētu palīdzēt uzstādīt diagnozi, izvērtēt mākslīgās apaugļošanas iespēju un potenciālos riskus, kā arī atvieglot pāra ģenētisko konsultēšanu.

## 2. Ieteiktais algoritms Y hromosomas mikrodelēciju noteikšanai

Kādos gadījumos jāveic Y hromosomas mikrodelēciju analīze? Pēc citu autoru datiem un darbā iegūtajiem rezultātiem, Y hromosomas mikrodelēciju analīze jāveic neauglīgiem vīriešiem, kuriem novēro samazinātu spermatozoīdu skaitu ( $<5 \times 10^6/\text{mL}$ ) – smagu oligozoospermiju vai spermatozoīdu trūkumu ejakulātā – azoospermiju, kuras pamatā nav obstrukcijas, neauglība nav ārējās vides izraisīta, un tās cēlonis nav hormonāli traucējumi vai citoģenētiska patoloģija (skatīt algoritmu)

Izvērtējot šajā pētījumā iegūtos datus un literatūrā aprakstīto, ir iespējams izdalīt trīs gadījumus, kad būtu jāizvēlas veikt Y hromosomas mikrodelēciju analīzi:

- 1) lai noteiktu neauglības etioloģiju un precizētu neauglības diagnozi;
- 2) lai izlemtu par sēklinieku biopsijas nepieciešamību/lietderīgumu azoospermijas gadījumos un spermatozoīdu ekstrakciju no sēkliniekiem;
- 3) lai veiktu pāra ģenētisko konsultēšanu, pirms tiek veikta mākslīgā apaugļošana.

---

### Algoritmā izmantoto saīsinājumu skaidrojums:

LH – lutenizējošais hormons;

FSH – folikulu stimulējošais hormons;

T – testosterons;

Azoospermija – nav spermatozoīdu ejakulātā;

Oligozoospermija – samazināts spermatozoīdu skaits ejakulātā;

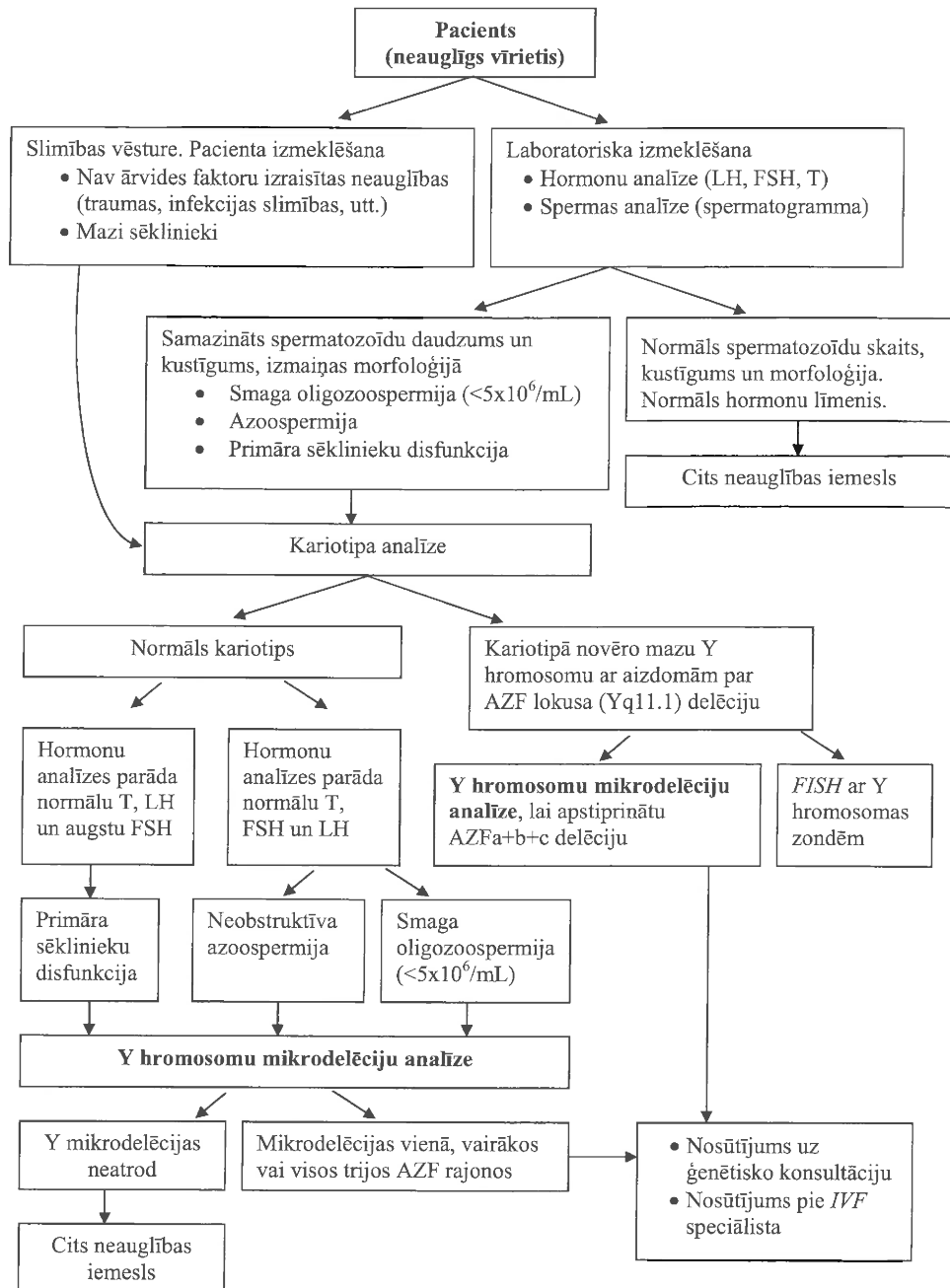
*FISH* – fluorescentā hibridizācija (fluorescent in situ hybridization);

*IVF* – mākslīgā apaugļošana (in vitro fertilization).

---



## Algoritms Y hromosomas mikrodelēciju noteikšanai vīriešu neauglības gadījumā



## **2.1. Y hromosomas mikrodelēciju analīze neauglības diagnozes precizēšanai un slimības etioloģijas noteikšanai**

Izvērtējot literatūras datus (Krausz & McElreavey, 1999; Simoni et al., 2004; Bhasin, 2007), kā arī šajā darbā iegūtos mikrodelēciju analīzes rezultātus un spermatozoīdu parametrus, var secināt, ka Latvijas neauglīgajiem vīriešiem mikrodelēcijas novēro gadījumos, kad spermatogrammas dati liecina par smagu neauglības formu, respektīvi, spermatozoīdi ejakulātā nav atrodamai vai arī mikroskopijas redzes laukā novēro tikai nedaudz spermatozoīdu. Tādējādi varētu ieteikt mikrodelēciju analīzi veikt vīriešiem ar idiopātisku neauglību (skatīt algoritmu), ja spermatozoīdu skaits ir  $<5 \times 10^6/\text{mL}$ . Mikrodelēciju analīze vīriešiem ar vieglākām neauglības formām nebūtu rekomendējama, jo Y hromosomas mikrodelēciju biežums šajā grupā ir ļoti zems. Lai precizētu, vai mikrodelēcijām pastāv vēl kāda korelācija bez jau iepriekš minēto spermatozoīdu skaita samazināšanos ejakulātā, ir veikti dažādi pētījumi un meklēta iespējamā saistība ar citiem reproduktīvās sistēmas traucējumiem, piemēram, hormonālām izmaiņām (Oates et al., 2002), anatomiskiem defektiem (Reyes-Vallejo et al., 2006). Tika apstiprināts, ka mikrodelēcijas Y hromosomā nav saistītas ar hormonālām izmaiņām, kā arī tās nenovēro vīriešiem ar zināmu neauglības iemeslu, piemēram, kriptorhismu vai pārslimota epidēmiskā parotīta radītu orhītu. Y hromosomas mikrodelēcijas nav nepieciešams noteikt arī pacientiem ar obstruktīvu azoospermiju, jo šajos gadījumos jāmeklē citi cēloņi, tādi kā anatomiski defekti vai citi ģenētiski determinēti iemesli, piemēram, mutācijas *CFTR* gēnā.

## **2.2. Y hromosomas mikrodelēciju analīze azoospermijas pacientiem pirms sēklinieku biopsijas veikšanas**

Idiopātiskas azoospermijas (neobstruktīvas) gadījumā molekulāro Y hromosomas mikrodelēciju analīzi iespējams izmantot kā alternatīvu – pacientam “draudzīgu” metodi, lai noskaidrotu nobriedušu spermatozoīdu klātbūtni vai to trūkumu sēkliniekos, pirms sēklinieku biopsijas veikšanas. Lai noteiktu spermatozoīdu klātbūtni, neizmantojot Y hromosomas mikrodelēciju noteikšanas metodi, jāveic sēklinieku biopsija. Pēc tam seko biopsijas parauga gēnu ekspresijas analīze, lai sēklinieka audos noteiktu marķiera gēnu, kas tiek ekspresēts spermatīdās vai nobriedušos spermatozoīdos. Šīs ekspresijas konstatēšana liecina, ka sēkliniekos ir nobrieduši spermatozoīdi. Gadījumos, kad neauglīgs vīrietis izvēlas veikt mākslīgās

apaugļošanas procedūru (*intracytoplasmic sperm injection, ICSI*), nepieciešams veikt sēklinieku biopsiju jeb spermatozoīdu ekstrakciju no sēkliniekiem (*testicular sperm extraction, TESE*). Pirmkārt, sēklinieku biopsija ir nepatīkama procedūra pacientam, otrkārt, iespējams, ka tā tiks veikta veltīgi, jo netiks atrasti nobrieduši spermatozoīdi, un visbeidzot, iespējams, pacients būs jāpakļauj atkārtotai sēklinieku biopsijai, lai iegūtu nobriedušus spermatozoīdus tālākām mākslīgās apaugļošanas manipulācijām. Tādējādi, izmantojot Y hromosomas mikrodelēciju noteikšanas metodi un noskaidrojot AZF delēciju variantu pirms sēklinieku biopsijas, tiek aiztaupīta pacientam nevajadzīga/nelietderīga procedūra, kā arī dārgas un laikietilpīgas gēnu ekspresijas analīzes. Pacientu grupai ar AZFa un AZFb mikrodelēcijām nav ieteicams veikt sēklinieku biopsiju, lai ekstrahētu spermatozoīdus un veiktu turpmāku *ICSI*, jo parasti šīs procedūras nav veiksmīgas un nesniedz vēlamo rezultātu (Vogt, 2005). Mikrodelēcijas, kas skar vairāk nekā vienu AZF rajonu (AZFa+c un AZFa+b+c), arī ir saistītas ar situāciju, kad ar sēklinieku biopsijas palīdzību nav iespējams iegūt spermatozoīdus (Brandel et al., 1998). Turklāt, ja pacienta Y hromosomā atklātas daļējas AZFb, AZFc vai arī pilna AZFc rajona delēcijas, tad 50% gadījumu nobriedušus spermatozoīdus atrod vismaz dažos izlocītajos sēklinieku kanāliņos. Parasti minētajai pacientu grupai dažos sēklinieku kanāliņos novēro pilnu spermatoģenēzes procesu, kā rezultātā dažreiz pat iespējams novērot dažus nobriedušus spermatozoīdus pacienta ejakulātā (piemēram, kriptozoospermijas gadījumā, ja spermatozoīdu skaits < 1milj/ml) (Vogt, 2005).

### ***2.3. Y hromosomas mikrodelēciju analīze un pāra ģenētiskā konsultēšana, pirms tiek veikta mākslīgā apaugļošana***

Neauglīgiem vīriešiem, kuri atbilst iepriekš aprakstītajiem kritērijiem, Y hromosomas mikrodelēciju analīze ir nozīmīga ne tikai diagnozes uzstādīšanai, bet arī ģenētiskajai konsultēšanai pirms mākslīgās apaugļošanas procedūras. Y hromosomas izmaiņas, kas ir konstatētas pacienta Y hromosomā ar *ICSI* metodes palīdzību, tiks nodotas 100% visiem vīrišķā dzimuma pēcnācējiem. Ir zināms, ka vīrišķā dzimuma pēcnācējiem, kuru tēvu Y hromosomā novēro mikrodelēcijas (biežāk AFZc), būs tāds pats Y hromosomas genotips (Silber et al., 1998; Mau-Kai et al., 2008; Poongathai et al., 2009). Zināmi arī tādi gadījumi, kad AZFc rajona delēcijas, kas tiek pārmantotas mākslīgās apaugļošanas rezultātā, vīrišķā dzimuma pēcnācēju Y hromosomā izmainās

– kļūst lielākas, jo AZF rajoni ir pakļauti *de novo* mutāciju rašanās iespējai, kam pamatā ir homologā rekombinācija (Kuroda-Kawaguchi et al., 2001; Chan et al., 2002). Tāpēc ģenētiskajā konsultēšanā pāri vajadzētu informēt, ka, izmantojot neauglīga vīrieša (tēva), kurš ir pozitīvs pēc Y hromosomas mikrodelēcijām, spermatozoīdus *ICSI* procedūrā, visi vīrišķā dzimuma pēcnācēji saņems šo ģenētisko defektu un arī būs neauglīgi. Taču pozitīvi ir tas, ka Y hromosomas mikrodelēcijas nav saistītas ar citām veselības problēmām kā tikai ar neauglību. Savukārt visi sievišķā dzimuma pēcnācēji būs veseli un auglīgi, jo Y hromosomu no tēva nemantos.

### 3.Y hromosomas mikrodelēciju noteikšanas metožu salīdzinājums

Mikrodelēcijas pēc definīcijas ir delēcijas, kuru izmēri ir mazāki par gaismas mikroskopa izšķirtspēju (Shaffer, 1997). Analizējot cilvēka hromosomas ar rutīnas citoģenētiskās analīzes palīdzību, iespējams izšķirt 400 – 500 joslas metafāzes hromosomā. Šajā līmenī var atklāt 5 – 10 Mb lielas delēcijas. Delēcijas, kas mazākas par 5 – 10Mb, var noteikt ar molekulārām metodēm – izmantojot polimerāzes ķēdes reakciju (*PCR*), fluorescento *in situ* hibridizāciju (*FISH*), *PRINS* (Primed *IN Situ* labeling) un citas metodes.

Ir vairākas uz *PCR* balstītas molekulārās metodes, ar kuru palīdzību iespējams noteikt Y hromosomas mikrodelēcijas. Šo metožu pamatā ir viens princips, un tiek izmantota multipleksā *PCR*. Metodes princips ir noteikt Y hromosomas AZF rajonos lokalizētu, šiem rajoniem specifisku DNS secību (marķieru, *STS* – *sequence target sites*) klātbūtni vai trūkumu. Metodes atšķiras ar to, cik vienkārši, ātri, nepieļaujot kļūdas, iespējams realizēt attiecīgo analīzi (11. tabula). Mēs salīdzinājam divas metodes – komerciāli pieejamo Y hromosomas mikrodelēciju noteikšanas metodi (Promega 2.0) un *EMQN* (Eiropas Molekulārās ģenētikas kvalitātes kontroles apvienība, *the European Molecular Genetics Quality Network*) ieteikto multiplekso *PCR* (Simoni et al., 2004) Y hromosomas mikrodelēciju analīzei. Komerčiālais komplekts aptver 21 Y hromosomas lokusu (marķieri), no kuriem divi *STS* ir reakciju kontroles, bet pārējie 19 atrodas noteiktos AZF rajonos. Savukārt *EMQN* mikrodelēciju noteikšanas rekomendācijas iesaka analīzē izmantot astoņus marķierus, no kuriem divi marķieri tiek izmantoti kā *PCR* kontroles, bet pārējie seši atrodas AZF rajonos (katrā AZF rajonā divi marķieri). Varētu domāt, ka komerciālais komplekts ir labāks, jo tiek izmantoti vairāki marķieri un tāpēc analīze ir specifiskāka, bet tomēr tā

nav, jo *EMQN* rekomendāciju autoriem izdevies pierādīt, ka analīzei izvēlētie seši marķieri ir unikāli AZF rajoniem un ar tiem nekļūdīgi var noteikt pilnas AZFa, AZFb un AZFc rajonu delēcijas. Būtiskākais šo abu metožu salīdzinājumā ir pierādīt, kura no metodēm ir labāk pielāgota ātrai un kvalitatīvai Y hromosomas mikrodelēciju noteikšanai molekulārās ģenētikas laboratorijā (skatīt 11. tabulu).

11. tabula. **Komerčiāli pieejamās un *EMQN* rekomendētās Y hromosomas mikrodelēciju noteikšanas metožu salīdzinājums**

Parametri, pēc kā salīdzina	Komerčiāli pieejamā Y mikrodelēciju noteikšanas metode	<i>EMQN</i> rekomendētā mikrodelēciju noteikšanas metode
Izpildījums	Sarežģīta procedūru virkne izmeklējamā parauga sagatavošanai un analizēšanai.	Viegli izpildāma, vienkārša parauga sagatavošanas un analīzes shēma.
Laiks	Laikietilpīga	Ātra
Multiplekso <i>PCR</i> skaits	Katrs paraugs jāanalizē ar pieciem multiplexiem, līdz ar to pastāv pievienojamo reaģentu un paraugu sajaukšanas risks.	Katrs paraugs jāanalizē tikai ar diviem multiplexiem; mazs pievienojamo reaģentu un paraugu sajaukšanas risks.
<i>STS</i> marķieri	Izmanto 19 <i>STS</i> , liels marķieru skaits nedod labākus rezultātus, jo daudzi marķieri ir neinformatīvi.	Izmanto sešus <i>STS</i> , visi marķieri ir informatīvi.
Iekšējās kontroles marķieris	<i>SMCX/SMCY</i> , kas nav labi piemērota iekšējā <i>PCR</i> kontrole.	<i>ZFX/ZFY</i> , kas ir piemērotāka iekšējā <i>PCR</i> kontrole.
Rezultātu interpretācija	Sarežģīta analizēto paraugu gēla ainās interpretācija.	Viegli saprotama/izsekojama paraugu gēla ainās interpretācija.
Izmaksas	Dārga (~88 EUR par paraugu, neiekļaujot samaksu par analīzes veikšanu).	~ 10 X lētāka (~6 EUR par paraugu, neiekļaujot samaksu par analīzes veikšanu).

Ir arī vēl kāda cita komerciālās Promega noteikšanas tehnikas neprecizitāte – analīzē ir iekļauts tā saucamais ceturtais AZF rajons jeb AZFd rajons. AZFd rajonu pirmoreiz aprakstījis Kent-First ar kolēģiem 1999. gadā, un šis rajons atrodas starp AZFb un AZFc rajoniem un fenotipiski saistīts ar smagu teratozoospermiju (Kent-First et al., 1999). Taču, noskaidrojot AZF rajona sekvenci (Skaletsky et al., 2003), šobrīd akceptētais AZF rajonu iedalījums ir AZFa, AZFb un AZFc. Turklāt AZFb un AZFc rajoni pārklājas, bet šo pārklājuma rajonu nav nepieciešams izdalīt kā ceturto rajonu, jo nepastāv no pārējiem AZF rajoniem klīniski atšķirīga (piemēram, teratozoospermijas) pacientu grupa (Simoni et al., 2004). Līdz ar to vēl joprojām komerciālais komplekts analizē ģenētiski neakceptētu AZF rajonu un lieto marķierus,

kas lokalizēti šajā rajonā, bet nav informatīvi neauglīgiem vīriešiem (Kuruda-Kawaguschī et al., 2001; Skaletsky et al., 2003). Turpretim *EMQN* rekomendācijas Y hromosomas analīzei rekomendē lētāku, ērtāku, ātrāku, pēc Y hromosomas AZF rajonu strukturālajām īpatnībām un pacientam nozīmīga klīniskā raksturojuma standartizētu Y mikrodelēciju noteikšanu metodi.

Pastāv arī citas Y hromosomas mikrodelēciju noteikšanas metodes, piemēram, molekulārā citoģenētikas metode *PRINS* (Primed *IN Situ* labeling) (Kadandele et al., 2002), DNS čipu tehnoloģija (Lee et al., 2004) vai genotipēšana (Yeom et al., 2008). Šie protokoli ir interesanti, pārsvarā balstīti uz *EMQN* izveidotās shēmas principa, taču ir laikietilpīgi, sarežģīti izpildāmi vai prasa jaunāko tehnoloģiju – dārgu analizatoru iegādi analīzes veikšanai rutīnas diagnostikā.

Apkopojot šī darba ietvaros paveikto, kā arī abu iepriekš aprakstīto molekulāro metožu salīdzinājumu, var secināt, ka molekulārās ģenētikas laboratorijā rutīnas Y hromosomas mikrodelēciju diagnostikai piemērotāka un precīzus rezultātus atspoguļojoša metode ir *EMQN* ieteiktā analīzes pieeja. Līdz ar to Latvijā ir aprobēts vienkāršs Y hromosomas mikrodelēciju noteikšanas *PCR* protokols, kura pamatā ir *EMQN* ieteiktā shēma, taču veiktas dažas modifikācijas (aprakstītas promocijas darba izvērstajā versijā), lai piemērotu analīzi konkrētas laboratorijas apstākļiem.

### **3.1. Pilnu *AZFa+b+c* Y hromosomas delēciju noteikšanas metodes – citoģenētiskās pret molekulārajām**

Dažreiz var būt situācijas, kad ir svarīgi noteikt delēcijas/mikrodelēcijas izmērus, lai precizētu ģenētiskā materiāla pārkārtojumus Y hromosomā. Šajā pētījumā diviem no pieciem pacientiem (1. attēls, paraugi nr.4. un nr.5.), kuriem Y hromosomā atklātas mikrodelēcijas, bija zaudēti visi trīs AZF rajoni (*AZFa+b+c* delēcija). Citoģenētiskās analīzes parādīja nelielu Y hromosomu, ko varētu skaidrot kā gandrīz visa Y hromosomas garā pleca delēciju, vai tā varētu būt Y hromosomas īso plecu izohromosoma. Abi minētie Y hromosomas aberāciju varianti bieži sastopami azoospermijas pacientiem. Šie varianti parasti izveidojas pēc pārrāvuma Y hromosomas garā pleca q11 rajonā, kā rezultātā tiek zaudēti visi AZF rajonos lokalizētie, par spermatoģenēzi atbildīgie gēni (Vogt et al., 2005).

Lai precizētu Y hromosomas mikrodelēciju robežas, *EMQN* rekomendācijas iesaka izmantot papildus *STS*, lai noskaidrotu delēcijas lūzuma punktus. Šajā darbā

tika izmantota alternatīva pieeja – AZFa+b+c delēciju paraugi tika analizēti ar Y hromosomas mikrosatelītu noteikšanas kitu, kas paredzēts Y hromosomas haplotipu noteikšanai. Šajā metodē izmantotie mikrosatelīti ir informatīvi, to klātbūtne varētu liecināt par noteiktu Y hromosomas fragmentu eksistenci interesējošajos AZFa+b+c delēciju paraugos. Diemžēl šo mikrosatelītu analīze nedeva sagaidāmo rezultātu – neapstiprinājās garajā plecā lokalizēto mikrosatelītu klātbūtne un līdz ar to nebija iespējams pierādīt, ka šo pacientu Y hromosoma nav īso plecu izohromosoma. Arī šajā gadījumā ne multipleksā PCR, ne Y mikrosatelītu analīze nespēj noteikt šo ģenētisko izmaiņu. Šajā gadījumā pirmā izvēle ir molekulārās citoģenētikas metodes (*fluorescent in situ hybridization, FISH*), kur ar specifisku fluorescento iezīmju (zondes) palīdzību iespējams noteikt, vai šo neauglīgo vīriešu Y hromosomai ir divi īsie pleci (izohromosoma).

Neskatoties uz to, ka multipleksās PCR un Y hromosomas mikrosatelītu analīzes AZFa+b+c delēciju gadījumā (1. attēls, paraugi nr.4. un nr.5.) mūsu pētījumā neizslēdza izohromosomas iespējamību, iegūtie dati ļauj izdarīt citus secinājumus par AZFa+b+c delēcijām. Skaidri zināms, ka abu AZFa+b+c delēcijas pacientu Y hromosomām ir īsais plecs, par ko liecina *SRY* un *ZFY* gēniem atbilstošo *STS* klātbūtne (multipleksās PCR rezultāti), kā arī mikrosatelīta *DYS393* un 4. paraugam arī mikrosatelīta *DYS19* klātbūtne. Tomēr abām metodēm ir trūkums – nevar precīzi zināt, cik īso plecu ir attiecīgajai Y hromosomai. Varētu izmantot faktu, ka abiem paraugiem mikrosatelīts *DYS393* un vienam paraugam mikrosatelīts *DYS19* ir sastopami to klasiskajā formā: *DYS393* mikrosatelīts atkārtots 14 reizes (tetranukleotīds [AGAT]<sub>14</sub>) un *DYS19* mikrosatelīts atkārtots 15 reizes (tetranukleotīds [TAGA]<sub>15</sub>). Ja šo mikrosatelītu atkārtojumu skaits būtu dubultots, tad droši varētu apgalvot, ka analizētās ir Y īso plecu izohromosomas. Savukārt AZFa+b+c delēcijas paraugu Y hromosomas garajā plecā neizdevās noteikt nevienu no marķieriem (visas metodes pierādīja delēciju). Marķieri, kas atrodas tuvu Y hromosomas centromērai un varētu pierādīt Y hromosomas garā pleca klātbūtni, Yq makrodelēciju gadījumā varētu būt *DYS391* mikrosatelīts (Y mikrosatelītu analīzes kits) un arī *DYS271* mikrosatelīts (Promega 2.0 mikrodelēciju noteikšanas kits). Mūsu pētījumā abi mikrosatelīti netika novēroti abu pacientu (nr.5. un nr.4.) Y hromosomās, taču, neskatoties uz to, šo mikrosatelītu klātbūtne citos gadījumos varētu pierādīt Y hromosomas garā pleca klātbūtni. Līdz ar to var izteikt vēl vienu hipotēzi, ka *DYS391* vai *DYS271* mikrosatelīti, tā kā atrodas tuvu Y hromosomas centromērai,

iespējams, arī var norādīt uz Y hromosomas garā pleca klātbūtni gadījumos, kur būtu notikusi Y hromosomas garā pleca delēcija. Tātad, lai precizētu Y hromosomas ģenētiskā materiāla izmaiņas abiem pacientiem, vajadzētu veikt kādu no molekulārās citoloģijas analīzēm. Šo situāciju varētu atrisināt *FISH* analīze ar specifiskām *SRY* fluorescentām zondēm, taču pacienti šo analīzi nevēlējas veikt. *FISH* tikai pierādītu Y hromosomas aberācijas veidu, bet tai nebūtu terapeitiskas nozīmes, jo visu trīs *AZF* rajonu delēcijas, kā zināms, tika noteiktas jau ar multipleksās *PCR* metodes palīdzību, tādējādi uzzinot azoospermijas iemeslu.

#### 4. Y hromosomas haplogrupas un to saistība ar vīriešu neauglību

Tiek uzskatīts, ka Y hromosomas haplogrupu izplatība pasaulē atspoguļo nejaušus notikumus, tādus kā gēnu dreifs, populāciju ekspansija un migrācija. Dabiskās izlases ietekme šajos procesos nav zināma, un tiek izteiktas hipotēzes, ka tā ir nenozīmīga. Tomēr ignorēt dabisko izlasi būtu nepareizi, jo Y hromosomā ir gēni, kas atbild par spermatogēnēzi, līdz ar to pret tiem izlase var darboties (Carvalho et al., 2003). Ja kāds gēns ir funkcionāli nozīmīgs, tad tiek sagaidīts, ka šim gēnam jābūt evolucionāri konservatīvam un sastopamam arī radniecīgu sugu īpatņos. Līdz ar to reproduktīvi veiksmīgu gēnu vai ģenētisko variāciju biežumam ir jāpieaug cilvēka populācijās evolūcijas gaitā, un, balstoties uz šo faktu, pretēji jānotiek ar to gēnu vai ģenētisko variantu biežumu, kas samazina auglību, – tam būtu jāsamazinās populācijā. Iepriekš izskaidrotā hipotēze tiešā veidā attiecas uz Y hromosomu. Tādējādi neizdevīga mutācija (piem., auglību samazinoša) var tikt saglabāta pēc citiem faktoriem (piem., piemērota konkrētiem vides apstākļiem) izdevīgā Y hromosomā (haplogrupā) un pat tās biežums varētu pieaugt populācijā vai palikt konstants. Turpretim izdevīga mutācija neizdevīgā Y hromosomas variantā var tikt zaudēta (negatīvā selekcija). Derīgo Y hromosomas variantu biežums pieaugtu, ja notiktu pozitīva šo variantu selekcija. Visekstremālākais varētu būt gadījums, kas noved pie pilnīga spermatogēnēzes zuduma – tāds netiks pārmantots nākamajā paaudzē un to populācijā novēros ļoti zemā frekvencē – sastaps tikai neauglīgo personu genotipos (Tyler-Smith, 2008). Vairāki pētījumi ir norādījuši uz Y hromosomas variantu jeb haplogrupu saistību ar samazinātu spermatozoīdu skaitu (Krausz et al., 2001a; Arredi et al., 2007; Yang et al., 2008). Šie pētījumi demonstrē selektīvus procesus, kuros ir iesaistīti Y hromosomas gēni.



Latviešu Y hromosomas genofondu veido četras galvenās Y hromosomas haplogrupas – N3a1 (K\* klastera N apakšklastera N3 haplogrupas apakšhaplogrupa), R1a1 (K\* klastera R apakšklastera R1 haplogrupas apakšhaplogrupa), K\* (K\* klasteris bez Hg N3a un Hg R1a) un I (F\* klastera IJ apakšklastera haplogrupa). Tās pārstāvētas gan neauglīgo vīriešu, gan kontroles (latvieši trijās paaudzēs) grupās, kā arī ir dominējošās haplogrupas Eiropas ziemeļaustrumu daļā, kas savukārt norāda uz minēto haplogrupu kopīgo izcelšanos un pirmsvēsturi.

Biežāk sastopamā haplogrupa Latvijā gan neauglīgo vīriešu (30,4%), gan kontroles (42,5%) populācijā ir N3a1 haplogrupa, kas statistiski ticami neatšķiras abās analizētajās grupās ( $p=0,223$ ), un līdz ar to Hg N3a1 nav saistīta ar vīriešu neauglību. Tas varētu liecināt, ka Hg N3a1 ir reproduktīvi veiksmīga un vīriešu neauglības iemesls ir kāds cits, nevis Y hromosomā lokalizētie gēni, kas atbild par spermatogēnēzi. Tomēr, sīkāk izpētot Hg N3 (haplogrupa, kurai pieder N3a1 apakšhaplogrupa) raksturīgo Y hromosomas variantu, ir noskaidrots, ka šai haplogrupai pieder visas Y hromosomas, kurās novēro arī divu *DAZ* gēnu – *DAZ3* un *DAZ4* – delēciju (Fernandes et al., 2004; Machev et al., 2004, Yang et al., 2008). Tas skaidrojams ar daļējām AZFc rajona delēcijām, kuras var tikt pārmantotas un ne vienmēr izpaužas kā neauglība. Pilnas AZFc delēcijas gadījumā tiek zaudēti deviņi gēni, kas pārstāv trīs gēnu saimes – *BPY2*, *DAZ* un *CDY1*, attiecīgi fenotipā tas izpaužas kā spermatogēnēzes traucējumi jeb neauglība. Pretēji tam, ja tiek zaudēti pieci gēni un AZFc rajonā paliek viens *BPY2*, viens *CDY1* un divi *DAZ* (*DAZ1* un *DAZ2*) gēni, vīriešiem ir normāla spermatogēnēze; šāds Y hromosomas N3 haplogrupai piederošs variants tiek pārmantots no paaudzes uz paaudzi (Tyler-Smith, 2008). Tomēr jāpiemin labi zināms fakts, ka Y hromosomas mikrodelēcijām ir tendence rasties no jauna homologās rekombinācijas ceļā. Līdz ar to nekaitīgie daļēji deletētie AZFc Y hromosomas varianti (*DAZ3/DAZ4* deletētie N3 haplogrupas varianti) var tikt izmainīti – *de novo* delēcijas dēļ var tikt zaudēti vēl kādi AZFc rajona gēni un rasties pilna AZFc rajona delēcija. Tādējādi šādi daļēji deletētie AZFc varianti tiek pārmantoti izmainīti nākamajās paaudzēs un vīrišķā dzimuma pēcnācējiem izpausties kā neauglība. Līdz ar to kāda daļa šo *DAZ3/DAZ4* deletēto N3 haplogrupas variantu varētu tikt zaudēti gēnu dreifa dēļ. Tā kā zināms, ka *DAZ3/DAZ4* delēcija raksturīga N3 haplogrupai, tad, izmantojot zināmo Hg N3 izplatību pasaulē, iespējams izsekot arī šī varianta sastopamībai. N3 haplogrupa, kā jau iepriekš pieminēts, izplatīta Ziemeļeiropā un Āzijā, kur veido 12% no visām

sastopamajām Y haplogrupām. Dažās populācijās tā ir viena no biežākajām haplogrupām, tā, piemēram, somu populācijā tās biežums ir 52%, jakutu populācijā 86% (Zerjal et al., 1997) un Latvijas populācijā 42,5%. Iespējamais N3 haplogrupas kopīgais sencis eksistējis pirms 8800 – 3200 gadiem (Hammer un Zegura, 2002). Tāpēc N3 haplogrupa ir sena un veiksmīga Y hromosomas līnija un *DAZ3/DAZ4* delēcijām nav kaitīga efekta attiecībā uz šo Y hromosomu nesēju auglību. Pastāv uzskats, ka Y hromosomas strukturālās izmaiņas, kas raksturīgas N3 haplogrupas apakšhaplogrupām, kā parāda arī mūsu pētījums (Hg N3a1), spēj pasargāt no neauglības, tāpēc šī haplogrupa ir reproduktīvi veiksmīga. Par to liecina arī citi pētījumi, kuros novērots tā saucamais daļējo AZFc rajonu delēciju kompensējošais mehānisms, t.i., pēc noteiktu vienas gēnu saimes gēnu delēcijas ir notikusi citu šīs gēnu saimes gēnu duplikācija (Repping et al., 2003; Lin et al., 2007; Giachini et al., 2008; Navarro-Costa et al., 2010).

Otra biežāk sastopamā Y hromosomas haplogrupa abās analizētajās paraugkopās ir Hg R1a1. Turklāt Hg R1a1 ir mazāk sastopama ( $p=0,005$ ) neauglīgo vīriešu DNS paraugos (15,2%), salīdzinot ar kontroles grupu (39,2%). R1a1 haplogrupu var uzskatīt par vienu no reproduktīvi veiksmīgām Y hromosomas līnijām, jo tā vairāk raksturīga auglīgiem nekā neauglīgiem vīriešiem. Iespējams, ka līdzīgi N3a1 haplogrupai arī R1a1 haplogrupa saglabājas pozitīvās selekcijas dēļ. Hg R un Hg N nav tuvi radnieciskas, un to kopīgais sencis, iespējams, eksistēja pirms 36000 – 6000 gadiem (Hammer & Zegura., 2002). Par R haplogrupu ir minēti dažādi fakti – ir mēģināts pierādīt, ka Y hromosomās, kas pieder šai haplogrupai, arī novēro kādu gēnu delēcijas (daļējās AZFc rajona delēcijas), bet šo gēnu zudums neietekmē fertilitāti (Fernandes et al., 2004; Vogt, 2005). Iespējamais molekulārais skaidrojums tam ir notikusī inversija pre-N Y hromosomā (Vogt, 2005), kuras dēļ ir izcēlušies R haplogrupa, kas savukārt pasargā šo haplogrupu no delēcijām, kuras fenotipā izpaustos kā neauglība, jo invertētā secība AZFb un AZFc reģionā neļauj tik bieži notikt AZF rajonu delēcijām. Latvijas datiem līdzīgi rezultāti, ka R haplogrupa biežāk sastopama auglīgiem vīriešiem, salīdzinot ar neauglīgo vīriešu grupu, pieminēti arī citu zinātnieku darbos. Tā, piemēram, Gomes et al (2008) arī apgalvo, ka Hg R, kura vairāk pārstāvēta auglīgo vīriešu grupā, varētu būt pozitīvās selekcijas piemērs par labu auglības haplogrupas izplatībai populācijās.

Savukārt haplogrupa K\* (makrohaplogrupas M9 G alēles variants bez Hg N3a un Hg R1a) sastopama 25,3% neauglīgo vīriešu Y hromosomās, taču kontroles grupā

šīs haplogrupas sastopamība ir daudz mazāka (6,5%). Līdz ar to K\* haplogrupa varētu būt vairāk raksturīga neauglīgo vīriešu Y hromosomas līnijām ( $p < 0,001$ ) un K\* haplogrupu varētu nosaukt par “neauglības haplogrupu”. Haplogrupa K\* tika atrasta arī Y hromosomās dāņu populācijas pārstāvjiem (4,6%), un tās biežums, līdzīgi kā mūsu pētījumā, bija daudz lielāks neauglīgo dāņu vīriešu (28%) vidū salīdzinājumā ar kontroles grupu (Krausz et al., 2001a). Eiropā K\* klastera haplogrupas (Hg L, Hg N, Hg O, Hg P, Hg R) ir ļoti bieži pārstāvētas. Īpaši bieži tās ir pārstāvētas Ziemeļeiropā, tā, piemēram, sāmu populācijā to izplatība ir 46%, somu populācijā 63%, Baltijas valstīs > 70% (Latvijā 80%). Savukārt klastera augstā izplatība ziemeļu un austrumu Baltijas reģionos kontrastē ar pārējo Eiropas daļu. Ģermāņu valodās runājošās Ziemeļeiropas populācijās K klasteris sastopams retāk: Vācijas populācijā 6%, Ziemeļzvidrijas – 8%, Gotlandes – 8%, Dānijas – 4,6%, Norvēģijas – 4%. Tas, ka šis klasteris ir izplatīts gan somugru, gan baltu, gan ģermāņu valodās runājošajās populācijās, liecina par labu pieņēmumu, ka atrastā asociācija varētu būt primāri ģeogrāfiska. Pēc Krausz et al (2001) domām, K\* haplogrupas augsto sastopamību Dānijas neauglīgo vīriešu vidū (28%) var skaidrot divējādi. Pirmkārt, varbūt šī Y hromosomas līnija patiešām ir saistīta ar samazinātu spermatozoīdu skaitu, otrkārt, atšķirības analizēto paraugu kopās varbūt ir saistītas ar lokālām ģeogrāfiskām K\* Y hromosomas līnijas izplatības īpatnībām. Par ģeogrāfisko faktoru ietekmi šīs asociācijas gadījumā jādomā, jo literatūrā ir aprakstīti gadījumi par kļūdaini interpretētu Y haplogrupu saistību ar vīriešu neauglību, lai gan patiesais cēlonis bija Y hromosomas variantu ģeogrāfiska izplatība (Kuroki et al., 1999; Previdere et al., 1999). Tā kā Latvijas pētījumā neauglīgie vīriešu paraugi pārstāv visu Latvijas populāciju un salīdzinājumā izmantotie kontroles grupas paraugi arī pārstāv visu Latvijas populāciju, un starp Latvijas reģioniem nepastāv atšķirības K\* haplogrupas izplatībā, tad iegūtie rezultāti liecina par labu Y haplogrupas K\* asociācijai ar vīriešu neauglību. K\* haplogrupas saistību ar vīriešu neauglību ir noteikuši arī citi zinātnieki, tā, piemēram, pētot Ķīnas populāciju, atklāja, ka K\* haplogrupa statistiski ticami biežāk izplatīta neauglīgo vīriešu (2,8%) grupā, salīdzinot ar auglīgo vīriešu (0,78%) grupu ( $p=0,028$ ) (Lu et al., 2007). Dāņu pētījumā tika pierādīts, ka lielākajai daļai neauglīgo vīriešu, kuri piederēja K\* haplogrupai, novēro samazinātu spermatozoīdu skaitu (azoospermija, oligozoospermija). Līdz ar to var secināt, ka K\* līnijām ir zema reproduktīvā veiksmē, un, ja netiktu pielietota mākslīgās apaugļošanas procedūra, tad šādas Y hromosomas samērā ātri izzustu no populācijas negatīvas selekcijas dēļ.

Krausz et al (2001) izsaka hipotēzi par Dānijas populāciju, kur Hg K biežums auglīgo vīriešu vidū ir 5%, un, pieņemot, ka šīs Y hromosomas līnijas vidējā selektīvā pielāgotība ir 0,5, tad iespējams, ka K\* līnija izzustu no dāņu populācijas 12 paaudžu laikā. Līdzīgi varētu spriest par Latvijas populācijā sastopamo Hg K\* (6,5%) un negatīvo selekciju pret šo haplogrupu. Tomēr ir grūti spriest par K\* haplogrupas reprodutīvo veiksmi, veicot vienkāršotus aprēķinus, jo to ierobežo vairāki faktori, piemēram, Hg K\* hromosomas migrācijas trūkums no apkārtējām populācijām un tas, ka ne visas K\* apakšhaplogrupas ir vienlīdz jutīgas pret šo efektu. Jau iepriekš pieminēts, ka K\* ietver vairākas apakšhaplogrupas, no kurām N3 un R1 ir ar labu reprodutīvu veiksmi. Savukārt, kā pierādīts arī mūsu pētījumā, citas Y hromosomas K\* klastera apakšhaplogrupas vairāk raksturīgas pacientiem ar spermatogēnēzes traucējumiem, kas padara K\* par iespējamo neauglības riska haplogrupu.

Vēl mūsu pētījumā statistiski ticamas atšķirības ( $p < 0,001$ ) novēro M9-C alēli saturošiem Y hromosomas variantiem, salīdzinot kontroles grupas un neauglīgo vīriešu DNS paraugus. M9-C alēles varianti raksturīgi diviem Y hromosomas klasteriem – DE\* un F\* (Hg G, Hg H, Hg I, Hg J). Izņēmums ir Hg I (pieder F\*), kas sastopama neauglīgiem pacientiem, bet neparāda statistiski ticamas atšķirības, salīdzinot ar kontroles grupu. M9-C alēles neauglīgo vīriešu DNS paraugu grupa ir ļoti heterogēna, un ir nepieciešami papildu pētījumi, taču, pamatojoties uz literatūras datiem, var spriest, ka arī DE\* un F\* klasteriem ir noteikta saistība ar vīrieša auglību.

Lai novērtētu, kura no DE\* un F\* Y hromosomas haplogrupām predisponē neauglībai vai pasargā no neauglības, veikti vairāki pētījumi Ziemeļitālijas un Ķīnas populācijās. Šie novērojumi pamato, ka DE\* klastera E haplogrupa ir saistīta ar neauglību. Hg E Y hromosomas struktūras molekulārā analīze liecina par to, ka šī Y hromosomas līnija ir vairāk pakļauta b2/b4 (pilna AZFc rajona) mikrodelēcijām nekā citas Y haplogrupas (Arredi et al., 2007). Varētu domāt, ka jānotiek izlasei pret šo haplogrupu, tomēr šo negatīvo selekciju nenovēro. E haplogrupa ir plaši izplatīta Austrumu un Ziemeļāfrikā, Tuvajos Austrumos un Eiropā (Cruciani et al., 2004). Spermatogēnēzes traucējumus izraisošo Y hromosomas AZFc rajona mikrodelēciju biežums deletētās Y hromosomās ir mazāks par 0,03%, kas apmēram atbilst *de novo* delēciju rašanās frekvencei, bet tomēr ir nepietiekami augsts, lai selekcija dominētu pār gēnu dreifu (Repping et al., 2003). Jāpiebilst, ka selekcijas efekta izvērtētēšanu apgrūtina dažādu neauglības variantu eksistence, kas visi ir saistīti ar AZFc delēcijām

(no oligozoospermijas līdz azoospermijai un daļēju AZFc delēciju gadījumā pat līdz normospermijai).

Pretēji tam, ka E haplogrupas biežums ir palielināts Y hromosomas mikrodelēciju gadījumā, J haplogrupa ir mazāk sastopama šo pacientu grupā (3%, Arredi et al., 2007). Savukārt Ziemeļtālrijas kontroles populācijā J haplogrupas biežums ir 15%. Lai gan minētā atšķirība nav statistiski ticama, tomēr molekulārā Hg J variantā struktūra norāda, ka Y hromosomas, kuras pieder Hg J, aizsargā pret Y mikrodelēcijām. Hg J līnijas nesatur L1PA4. L1PA4 ir *LINE* elements (*long interspersed nuclear element*), kas insertēts Y hromosomas cilvēka endogēnā retrovīrusa *HERV* (*human endogenous retroviral DNA sequences*) sekvencē, kas savukārt atrodas AZFa lokusā. Tā kā evolūcijas gaitā Hg J Y hromosomas variants radies, pateicoties L1PA4 delēcijai (pierāda bialēliskā Y hromosomas marķiera 12f2 delēcija), līdz ar to šajās līnijās nevar notikt intrahromosomālās homologās rekombinācijas, kuru rezultātā tiktu zaudēts AZFa rajons (Jobling et al., 1998; Kamp et al., 2000).

Ķīnas pētījumā (Yang et al., 2008) tika noteikts, ka haplogrupas C (C\* klasteris) un DE\* ir vairāk pakļautas AZFc rajona deļējām delēcijām, bet turpretim O3\* (haplogrupa, kurai pieder K\* klastera NO\* apakšklasterim) pasargā pret šīm delēcijām. Šo haplogrupu pārstāvēto Y hromosomu molekulārie pētījumi liecina par noteiktu daļēju AZFc rajonu variantu klātbūtni šajās Y līnijās. Tā, piemēram, Hg DE\* varētu būt uzņēmīgāka pret *DAZI/DAZ2/CDY1a* gēnu delēciju AZFc rajonā, savukārt O3\* haplogrupa pasargā pret šo gēnu delēciju. Savukārt Hg C līnijas vairāk pakļautas *DAZI/DAZ2/CDY1b* delēcijām (Yang et al., 2008). Y hromosomai piemītošā patrilokalitāte ir galvenais faktors, kas nosaka tās piederību konkrētam ģeogrāfiskam reģionam – populācijai. Tādējādi veicot plašu Y haplogrupu un daļējo AZFc rajona delēciju variantu analīzi dažādās populācijās, būtu iespējams precizēt un atrast noteiktu Y haplogrupu variantu saistību ar spermatoģenēzes traucējumiem (Novaro-Costa et al., 2010). No tā var secināt, ka eksistē noteiktas Y hromosomas strukturālās izmaiņas, kas pārstāv noteiktas Y haplogrupas un ir saistītas ar vīrieša neauglību.

## Secinājumi

1. Lai noteiktu vīriešu reprodūktīvās patoloģijas molekulāri ģenētiskos cēloņus, tika veikta Y hromosomas mikrodelēciju, Y hromosomas haplogrupu un gēna *CFTR* fragmentu sekvenču analīze.
2. Latvijā Y hromosomas AZF rajona mikrodelēciju biežums vīriešiem ar idiopātisku neauglību ir 5%, un AZF mikrodelēcijas novēro smagu neauglības formu – azoospermijas vai oligozoospermijas – gadījumā.
3. Izveidots algoritms, kas var palīdzēt ārstiem, kuru redzeslokā ir pacienti ar neauglības problēmu, atlasīt tos neauglības gadījumus, kad ir svarīgi noteikt Y hromosomas mikrodelēcijas.
4. Aprobēta un ieviesta spermatoģenēzes traucējumu molekulārā analīzes metode, ar kuras palīdzību Latvijā būs iespējams diagnosticēt mikrodelēcijas Y hromosomas AZF rajonos.
5. Atrastas statistiski ticamas atšķirības neauglīgo vīriešu un kontroles grupas Y hromosomas haplogrupu izplatībā, kas liecina par noteiktu Y hromosomas variantu – “neauglības” haplogrupu iespējamību.
6. Analizētā gēna *CFTR* mutācija delF508, mutācija R117H, kā arī 8. introna poli-T un poli-TG polimorfismi neparāda saistību ar vīriešu neauglību, kas norāda uz to, ka šīm mutācijām un polimorfismiem nav tiešas ietekmes uz spermatoģenēzes procesu.
7. Izstrādāti ieteikumi pacientu ar neauglību ģenētiskajai konsultēšanai.

## Publikācijas un ziņojumi par pētījuma tēmu

### Publikācijas:

1. L.Timsa, A. Puzuka, L. Pliss, A. Krumina et al. *Human Y chromosome and its role in human pathology and population phylogenetic studies*. – Proceedings of the Latvian Academy of Sciences, Section B, 2005, vol.59, p. 93-108.
2. A.Puzuka, A.Krumina, N.Pronina, V.Lejins, J.Erenpreiss, J.Bars, I.Grinfelde, V.Baumanis. *Analysis of Y-chromosomal microdeletions and polymorphism of CFTR gene in infertile males – a study from Latvian population*. – Proceedings of the Ukrainian Academy of Sciences; Genetics, Selection and Biotechnology, 2007, p.575-578.
3. A.Puzuka, A.Krumina N.Pronina, V.Lejins, J.Erenpreiss, J.Bars, I.Grinfelde, V.Baumanis. *Molecular analysis of male infertility in Latvia*. - RSU Collection of Scientific Papers, Research Articles in Medicine and Pharmacy, 2007, p. 90-93.
4. A.Puzuka, I.Prane, J.Erenpreiss, A.Krumina. *CFTR gene and male infertility*. - RSU Collection of Scientific Papers, Research Articles in Medicine and Pharmacy, 2008, p. 97-100.
5. A.Puzuka, N.Pronina, I.Grinfelde, J.Erenpreiss, V.Lejins, J.Bars, L.Pliss, I.Pelna, V.Baumanis, A.Krumina. *Y chromosome – a tool in infertility studies of Latvian population*. - in press Russian Journal of Genetics, 2011, p. 1-7.

### Konferenču tēzes:

1. A.Krumina, L. Pliss, A. Puzuka et al. *Latvian population and its Indo-European roots by analyses of mitochondrial DNA (mtDNA) and Y chromosome data*. – 29<sup>th</sup> FEBS journal, 2005, Abstracts, p.131.
2. L.Pliss, L.Timsa, A.Puzuka, A.Krumina, V.Baumanis, K.Tambets, R.Villems. *Phylogeography of mitochondrial and Y – chromosomal lineages and genetic structure of Latvians*. -20<sup>th</sup> IUBMB International Congress of Biochemistry and Molecular Biology and 11<sup>th</sup> FAOBMB Congress, Kyoto, Japan, 2006, Abstracts, p.198.
3. L.Pliss, A.Puzuka, S.Rozane, A.Sabule, V.Baumanis, A.Krumina. *Y-chromosomal short tandem repeats (Y-STRs) and their applications for population studies and forensic casework in Latvia*. –The 5<sup>th</sup> ISABS conference in forensic genetics and molecular anthropology, Croatia, Abstracts, 2007, p.127.
4. L.Pliss, A.Puzuka, L.Timsa, I.Pelna, V.Baumanis, A.Krumina. *Genetic polymorphism of Y chromosome short tandem repeats (Y-STRs) in the Latvian population*. – European Journal of Human Genetics, Abstracts, 2007, vol.15, suppl.1, p.292.
5. A.Puzuka, A.Krūmiņa, N.Proņina, V.Lejiņš, J.Erenpreiss, J.Bārs, I.Grīnfelde. *Analysis of Y – chromosomal microdeletions in infertile males*.– RSU Zinātniskā konference, Rīga, 2007, Tēzes, 251.lpp.
6. A.Puzuka, A.Krumina, N.Pronina, V.Lejins, J.Erenpreiss, J.Bars, I.Grinfelde, V.Baumanis. *Microdeletions in AZF region of Y chromosome in infertile males, a study from Latvian population*. - European Journal of Human Genetics, Nice, France, 2007, Abstracts pp.208.-209.

7. L.Pliss, I.Pelnena, A.Puzuka, V.Baumanis, A.Krumina. *Genetic analysis of 12 Y-chromosomal STRs haplotypes in the Latvian population*. - The FEBS Journal, 2008, Abstracts, vol.275, suppl.1, p.424.
8. A.Puzuka, A.Krūmiņa, I.Prane, V.Baumanis. *Vīriešu neauglības ģenētiskie riska faktori – Y hromosomas mikrodelēcijas un mutācijas CFTR gēnā*. –RSU Zinātniskā konference, 2008, Tēzes, 239.lpp.
9. A.Puzuka, A.Krumina, I.Prane, I.Grinfelde, N.Pronina, V.Lejins, J.Erenpreiss, V.Baumanis. *Incidence of Y chromosomal microdeletions and CFTR gene mutations in infertile males in Latvia*. –The FEBS Journal, Athens, Greece, 2008, Abstracts, vol.275, suppl.1, p.100.
10. L.Pliss, I.Pelnena, A.Puzuka, A.Sabule, S.Rozane, A.Ivanovs, V.Baumanis, A.Krumina. *Y chromosomal short tandem repeats (Y-STRs) and its association with azoospermia factors' (AZF) microdeletions in infertile males*. – The American Society of Human Genetics, 58<sup>th</sup> Annual Meeting, Philadelphia, USA, 2009, Abstracts, p.166.
11. A.Puzuka, L.Pliss, N.Pronina, J.Ērenpreiss, V.Baumanis, A.Krūmiņa. *Vīriešu neauglības ģenētisko faktoru izvērtējums pēc Y hromosomas mikrodelēciju un haplogrupu datiem*. - RSU Zinātniskā konference, 2010, Tēzes, 97.lpp.
12. A.Puzuka, A.Krumina, N.Pronina, V.Lejins, J.Erenpreiss, J.Bars, I.Grinfelde, V.Baumanis. *Y-chromosome microdeletion and haplogroup patterns in Latvian population*- 4<sup>th</sup> Utah/Florence Symposium on the Genetics of Male Infertility, Utah, USA, 2010, Abstracts, p.55.

**Mutiskie ziņojumi konferencēs un Latvijas Zinātnes padomes (LZP) sadarbības projektu Nr.05.0023 un Nr.10.0010 sēdēs:**

1. Ziņojums “Latvijas populāciju raksturojoši Y hromosomas haplotipi” LZP sadarbības projekta Nr.05.0023 “Latvijas populācijas genofonda pētījumi un to izmantošana cilvēka patoloģijas diagnostikā un profilaksē” sēdē, 2004. gada 27. februārī.
2. Ziņojums “Populāciju ģenētika un tās praktiskā nozīme” Latvijas Universitātes 64. konferencē, 2006. gada 9. februārī.
3. Ziņojums “Vīriešu neauglības molekulāri ģenētiska izpēte” LZP sadarbības projekta Nr.05.0023 “Latvijas populācijas genofonda pētījumi un to izmantošana cilvēka patoloģijas diagnostikā un profilaksē” sēdē, 2007. gada 24. aprīlī.
4. Ziņojums “Vīriešu neauglības ģenētika” Latvijas Universitātes 66. konferencē, 2008. gada 13. februārī.
5. Ziņojums “Vīriešu neauglības ģenētisko faktoru izvērtējums pēc Y hromosomas mikrodelēciju un haplogrupu datiem” Rīgas Stradiņa universitātes zinātniskajā konferencē, 2010. gada 19. martā.
6. Ziņojums – promocijas darba prezentācija “Vīriešu reproduktīvās patoloģijas ģenētiskā riska faktoru izvērtējums Latvijas populācijā” LZP sadarbības projekta Nr.10.0010 “Slimību etioloģijas, patoģenēzes un cilvēka novecošanās procesu ģenētiskā izpēte Latvijas populācijā” sēdē, 2010. gada 18. maijā.
7. Ziņojums „Evaluation of male infertility genetic aspects according Y chromosome microdeletion and haplogroup data” Ziemeļvalstu un baltijas valstu andrologu (NAFA-BAA) zinātniskā konference, Tartu, Igaunija, 2010. gada 11. septembrī.



## Pateicības

Izsaku lielu pateicību visiem tiem cilvēkiem, kas visdažādākajā veidā ir palīdzējuši un atbalstījuši manu pētniecisko darbu. Īpaši vēlos pateikties:

Profesorei Astrīdai Krūmiņai par darba vadīšanu, iedvesmu, konsultācijām, padomiem, atbalstu un lielo pacietību darba gaitā.

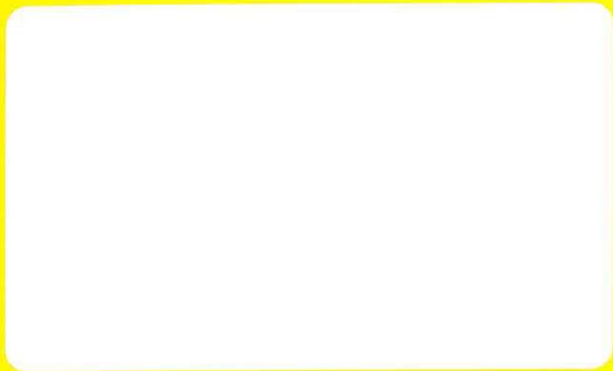
Profesoram Viesturam Baumanim par darba vadīšanu, konsultācijām, atbalstu, konstruktīvo kritiku un vērtīgajām diskusijām.

Maniem kolēģiem no Latvijas Valsts Biomedicīnas pētījumu un studiju centra un Rīgas Stradiņa universitātes Molekulārās ģenētikas zinātniskās laboratorijas par palīdzību šī darba tapšanā.

Ārstiem Jurim Ērenpreisam, Voldemāram Lejiņam, Ievai Grīnfeldei, Jānim Bāram, kā arī VSIA BKUS Medicīniskās ģenētikas klinikas DNS laboratorijas vadītājai Natālijai Proņinai par pacientu asins paraugiem un veiksmīgo sadarbību.

Profesoram Uldim Teibem par padomiem datu statistiskajā apstrādē.

Sirsnīgs paldies manai ģimenei un draugiem par iedrošinājumu, izpratni, atbalstu un pacietību darba tapšanas laikā.



RSU BIBLIOTÉKA



0221007649