

UDK 616.697-071

# Niska učestalost mikrolelecija AZF područja kromosoma Y u neplodnih muškaraca sjeverozapadne Hrvatske (Istre i Primorja)

## Low frequency of Y- chromosome microdeletions among infertile men from the North-Adriatic region of Croatia

Alena Buretić-Tomljanović<sup>1\*</sup>, Ivan Vlastelić<sup>2</sup>, Natalia Marić<sup>1</sup>, Sergej Nadalin<sup>1</sup>, Anđelka Radojčić Badovinac<sup>1,2</sup>

**SAŽETAK. Cilj:** Otkrivanje mikrolelecija AZF (engl. *azoospermia factor*) područja kromosoma Y u muškaraca s teškim poremećajem spermatogeneze važno je zato što se metodama medicinski potpomognute oplodnje mikrolelecije prenese na 100% muškog potomstva. **Ispitanici i metode:** Istražili smo prisutnost mikrolelecija Y kromosoma u 129 muškaraca s područja Istre i Primorja. Kliničke dijagnoze ispitanika bile su: azoospermija (N=33), teški oblik oligozoospermije (broj spermija manji od 5 milijuna/ml; N=25), oligozoospermija (N=47) i astenospermija (N=24). Neplodnost nepoznata uzroka imala su 84 ispitanika, dok su u ostalih utvrđeni još i hipogonadizam, kriptorhizam ili varikokela. Molekularno-genetička analiza napravljena pomoću četiri multipleks i jedne simpleks lančane reakcije polimeraze obuhvatila je 12 STS lokusa-biljega. Analizirani su STS-biljezi: sY84, sY86, sY127, sY134, sY254, sY255, kontrolni biljeg sY14 (SRY) i pseudoautosomski lokus ZFX/ZFY prema preporuci Europske androloške akademije. U ispitanika u kojih su pronađene mikrolelecije analizirani su dodatni STS-biljezi: sY87, sY88, sY114, sY135, sY152 i sY157 radi utvrđivanja njihova opsega. **Rezultati:** Mikrolelecije su pronađene u dva ispitanika (2/129 ili 1,55%). Obojica su imala kliničku dijagnozu idiopatske azoospermije. Učestalost mikrolelecija u grupi s azoospermijom iznosi 2/33 ili 6,06%, a u grupi s idiopatskom azoospermijom 2/18 ili 11,1%. Mikrolelecije nisu pronađene u ispitanika s ostalim dijagnozama neplodnosti, kao niti u kontrolnoj skupini muškaraca (N=100). U jednog ispitanika mikrolelecija je zahvatila AZFc potpodručje, dok se u drugoga proteže kroz AZFb i AZFc potpodručja. **Zaključak:** Učestalost mikrolelecija Y kromosoma niža je u našem uzorku ispitanika nego što je objavljeno za većinu europske populacije. U našoj populaciji pronalazak mikrolelecija AZF područja kromosoma Y povezan je s idiopatskom azoospermijom.

**Ključne riječi:** čimbenik azoospermije, mikrolelecije kromosoma Y, molekularno-genetička analiza, neplodnost muškaraca

**ABSTRACT. Aim:** The detection of microdeletions of AZF (azoospermia factor) region of Y-chromosome in men with severely impaired spermatogenesis is important since Y-chromosome microdeletions are transmitted to 100% of male offspring when using assisted reproduction methods. **Subjects and methods:** We investigated the presence of chromosome-Y microdeletions in 129 men from North-Adriatic region of Croatia. Their clinical diagnoses were: azoospermia (N=33), severe oligozoospermia (sperm count less than 5 million/ml; N=25), oligozoospermia (N=47), and asthenospermia (N=24). Eighty four of them had idiopathic infertility, while the rest of them were also diagnosed with hypogonadism, cryptorchidism or varicocele. Molecular-genetic analysis was performed using four multiplex and one simplex polymerase chain reaction (PCR). Twelve STS-markers were investigated. STS-markers: sY84, sY86, sY127, sY134, sY254, sY255, control marker sY14 (SRY), and control pseudoautosomal locus ZFX/ZFY were analyzed according to recommendation of European Academy of Andrology. In cases of detected microdeletion six additional markers were analyzed: sY87, sY88, sY114, sY135, sY152, and sY157. **Results:** Microdeletions were found in two men (2/129 or 1,55%). Both men were diagnosed with idiopathic azoospermia; therefore the frequency of microdeletions in the azoospermia group was 2/33 or 6,06%, while in the idiopathic azoospermia group was 2/18 or 11,1%. Chromosome Y microdeletions were not found in non-idiopathic infertility group nor control men (N=100). **Conclusions:** The frequency of microdeletions was lower in our sample than reported for many European populations. Idiopathic azoospermia carries the risk for diagnosis of Y- chromosome microdeletions in our population.

**Key words:** male infertility, azoospermia factor, microdeletions of chromosome Y, molecular-genetic analysis

<sup>1</sup>Zavod za biologiju i medicinsku genetiku, Medicinski fakultet Sveučilišta u Rijeci

<sup>2</sup>Odjel za humanu reprodukciju, Klinika za ginekologiju i opstetriciju, KBC Rijeka

Primljeno: 12. 5. 2008.

Prihvaćeno: 10. 7. 2008.

Adresa za dopisivanje:

\* Doc. dr. sc. Alena Buretić-Tomljanović, dipl. ing.,

Zavod za biologiju i medicinsku genetiku, Medicinski fakultet Sveučilišta u Rijeci, Braće Branchetta 22, 51 000 Rijeka  
e-mail: alena@medri.hr

<http://hrcak.srce.hr/medicina>

## UVOD

**Neploidnost** (nesposobnost začeca tijekom razdoblja od godine dana uz nezaštićene spolne odnose) i **umanjena plodnost** (stanje u kojem par u plodnom dijelu života trudnoću postiže nakon dužeg razdoblja nego što je to slučaj kod normalno plodnog para u kojega je mogućnost zanošenja po ciklusu prosječno 20%) pogađaju približno **15-20% bračnih parova**. Znatan dio (>40%) bračne neplodnosti uzrokovan je poremećajima spermatogeneze uslijed prethodne varikokele,

Glavni genetički uzroci muške neplodnosti jesu Klinefelterov sindrom (kromosomska konstitucija 47,XXY) i submikroskopske delecije (mikrodelecije) AZF (engl. *azoospermia factor*) područja kromosoma Y iako na spermatogenezu utječe niz gena raspršenih po čitavom genomu, a često je ometa i prisutnost strukturnih kromosomskih promjena.

obostranog kriptorhizma ili hipogonadizma. Uzroci muške neplodnosti mogu biti aglutinacija spermija, prisutnost protutijela upravljenih prema površinskim antigenima spermija, premalen volumen ejakulata, bolesti hipotalamusa ili hipofize, tumor testisa, te utjecaje gonadotoksina iz okoliša. Neplodnost muškaraca mogu uzrokovati bolesti poput cistične fibroze, nasljedne hemokromatoze, nedostatka receptora androgena, kongenitalne odsutnosti vas deferensa (CADV), a može biti udružena i sa sistemskim bolestima kao što su diabetes mellitus ili multipla skleroza. Iako na odvijanje spermatogeneze utječe niz gena raspršenih po čitavom genomu<sup>1,2</sup>, a često je ometa i prisutnost strukturnih kromosomskih promjena, glavni genetički uzroci muške neplodnosti jesu Klinefelterov sindrom (kromosomska konstitucija 47,XXY) i submikroskopske delecije (mikrodelecije) AZF (engl. *azoospermia factor*) područja kromosoma Y<sup>3</sup>. Prema literaturi se kromosomske abnormalnosti nađu u 11,5 – 17% neplodnih muškaraca<sup>4,5</sup>. Studija Raoa i sur.<sup>4</sup> i u indijskoj je populaciji potvrdila Klinefelterov sindrom kao najčešću kromosomsku promjenu u muškaraca s idiopatskom neplodnošću, dok su strukturne kromo-

somske promjene češće bile prisutne u neplodnih muškaraca s varikokelom.

Mikrodelecije AZF-područja kromosoma Y najčešće su udružene s teškim poremećajima spermatogeneze: teškim oblikom oligoastenospermije (tOAS) s <1x10<sup>6</sup> spermija/ml i azoospermijom (AZO) (potpunom odsutnošću spermija u ejakulatu). U muškaraca s potvrđenom AZO ili oligoastenospermijom (OAS) učestalost otkrivenih mikrodelecija u različitim studijama varira između 1 i 55,5%<sup>6</sup>, što je vjerojatno posljedica različitih kriterija pri odabiru bolesnika i različitih metoda detekcije Y-mikrodelecija. U prosjeku se mikrodelecije AZF područja nađu u 12,5% muškaraca s AZO i 4,7% onih s OAS<sup>7</sup>.

Mikrodelecije AZF-područja kromosoma Y su, kao mogući genetički uzrok muške neplodnosti, otkrili Tiepolo i Zuffardi 1976. godine<sup>8</sup>. U šestorice muškaraca utvrdili su postojanje *de novo* mutacija – manjih intersticijskih delecija unutar distalnog eukromatinskog dijela (Yq11) kromosoma Y koje nije bilo moguće otkriti klasičnim citogenetičkim analizama.

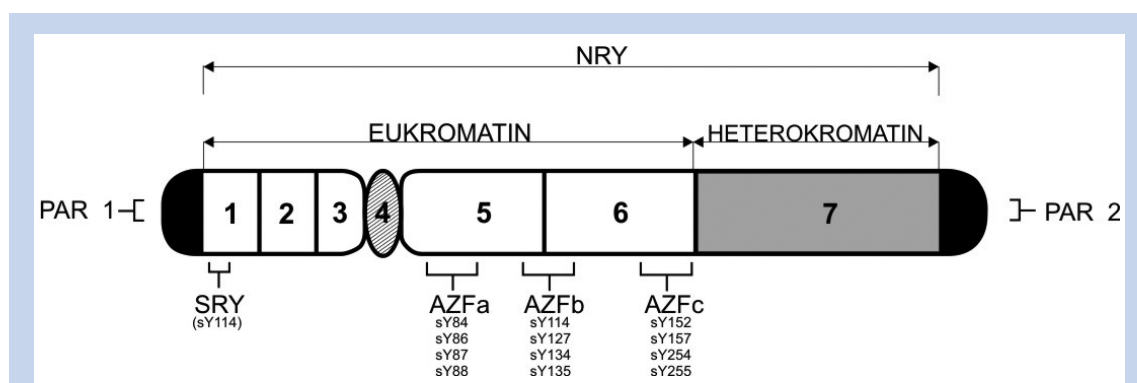
Kromosom Y sastoji se od dviju pseudoautosomnih regija PAR1 i PAR2 (veličine 2,6Mb, odnosno 0,4Mb), smještenih na krajevima obaju krakova, koji se tijekom gametogeneze sparuju i izmjenjuju genetički materijal s X kromosomom. Regija izvan PAR-ova se ne rekombinira (engl. *non-recombining region* – *NR*Y), zauzima 24Mb, a sastoji se od dijela Yp kraka (Yp11), proksimalnog eukromatina (Yq11, intervali 5 i 6) i distalnog heterokromatina (Yq12, interval 7) dugoga kraka kromosoma Y<sup>9</sup> (slika 1). Područje Yp11 sadrži lokus čimbenika determinacije testisa (engl. *testis determining factor* – *TDF* ili *sex-determining region* – *SRY*), nužnog za razvoj muške gonade, dok se na Yq11 nalazi lokus čimbenika azoospermije – AZF koji sadrži gene esencijalne za spermatogenezu (mikrodelecije nisu utvrđene u plodnih muškaraca s normozoospermijom). AZF područje kromosoma Y je podijeljeno na potpodručja AZFa, AZFb i AZFc i u potpunosti je mapirano. Sadrži 156 transkripcijskih (78 kodirajućih i 74 nekodirajućih) jedinica koje upravljaju sintezom 27 proteina<sup>3,10</sup>. AZFa potpodručje sadrži samo dva gena (USP9Y- engl. *ubiquitin-specific protease 9* i DBY- engl. *DEAD-box Y*) prisutna jednom kopijom, dok AZFb i AZFc potpodručja sadrže

24 gena od kojih su neki prisutni u multiplim kopijama, tako da je ukupan broj gena u AZFb i AZFc 46. U pravilu geni prisutni u multiplim kopijama jesu testis-specifični (izraženi isključivo u testisu), dok su geni prisutni jednom kopijom izraženi ne samo u testisu, već i u drugim tkivima, i obično su velikim dijelom homologni genima na kromosomu X<sup>11-13</sup>. Testis-specifični geni AZF područja koji nemaju X-vezane homologne gene građeni su od amplikona (niza DNA sljedova organiziranih u parove s invertiranom orijentacijom i međusobno jednakih >99.9%).

Amplikoni su, pak, organizirani u masivne, zrcalno simetrične DNA sljedove (palindrome)<sup>14</sup>. Upravo specifična organizacija AZF područja uvjetuje slučajne rekombinacijske događaje između ponovljenih identičnih DNA sljedova uz posljedični gubitak DNA<sup>15</sup>. Detaljan prikaz strukturne organizacije AZF područja kromosoma Y omogućio je dedukciju mehanizma nastanka mikrodelecija, te hipotetski zaključak o postojanju nekoliko glavnih modela mikrodelecija (o čemu zasad među znanstvenicima nije postignut konsenzus)<sup>3</sup>. Mikrodelecije najčešće zahvaćaju potpodručje AZFc (79%), slijede AZFb i kombinacija AZFb+c s 9%, odnosno 6%, dok se najnižom učestalošću mikrodelecije nađu u potpodručju AZFa (3%). Korelacija genotipa i fenotipa (modela mikrodelecije i kliničke slike) nije u potpunosti razjašnjena. Mikrodelecije unutar AZFa potpodručja povezuju se s pojavom sindroma samo Sertolijevih stanica (engl. *Sertoli*

*cell only syndrome* – SCOS) i AZO<sup>16</sup>. Potpune delecije potpodručja AZFb i kombinacije AZFb+c također pokazuju sliku SCOS-a i zastoja spermatogeneze s poljedičnom AZO. U pravilu nalaz potpunih mikrodelecija unutar AZFa i AZFb, te AZFb+c upućuje na nepostojanje zrelih spermija u tkivu testisa, te je kontraindikacija za primjenu metoda testikularne ekstrakcije spermija (engl. *testicular sperm extraction* – TESE) ili biopsije testisa<sup>17,18</sup>. Mikrodelecije koje zahvaćaju AZFc potpodručje, što je i najčešći slučaj, mogu biti udružene s vrlo raznolikom kliničkom i histološkom slikom koja varira od AZO do OAS. Opisani su i slučajevi prijenosa AZFc mikrodelecija s oca na sinove prirodnim putem<sup>19</sup>, kao i postupni prijelaz OAS u AZO uz AZFc mikrodeleciju. Niz je studija pokazao da se hormonski status (FSH, LH, testosteron, prolaktin) neplodnih muškaraca s mikrodelecijama kromosoma Y ne razlikuje od onih bez mikrodelecija<sup>7,20,21</sup>.

Budući da model otkrivene Y-mikrodelecije ima prognostičku vrijednost i može utjecati na odluku o izboru daljnjih terapijskih postupaka u neplodnih i muškaraca umanjene plodnosti, DNA analizom smo na prisutnost mikrodelecija Y-kromosoma testirali skupinu neselektiranih i skupinu selektiranih (idiopatska neplodnost) muškaraca s područja Primorsko-goranske i Istarske županije u kojih su utvrđeni poremećaj broja i/ili pokretljivosti spermija. Cilj istraživanja bio je otkriti prisutnost mikrodelecija kromosoma Y, odrediti njihovu



**Slika 1.** Shematski prikaz kromosoma Y i AZF područja

**Figure 1.** Schematic view of the Y chromosome and AZF region

**Legenda:** NRY (engl. *nonrecombining portion of the Y chromosome*) – nerekombinirajuće područje kromosoma Y; SRY (engl. *sex-determining region*) – ??????; PAR (engl. *pseudoautosomal region*) – pseudoautosomsko područje; AZF (engl. *azospermia factor region*) – područje čimbenika azoospermije

učestalost i time provjeriti u kojoj mjeri mikrodelecije kromosoma Y pridonose muškoj neplodnosti u našem uzorku. U tu svrhu DNA uzorci ispitanika testirani su dvjema multipleks lančanim reakcijama polimeraze (engl. *polymerase chain reaction – PCR*), prema preporuci Europske androloške akademije (EAA). Sljedeći cilj bio je, u slučaju potvrde mikrodelecije kromosoma Y, utvrditi njezin opseg unutar AZF područja kromosoma Y.

### ISPITANICI I METODE

Ispitanici u istraživanju su muškarci s područja Primorsko-goranske i Istarske županije Republike Hrvatske, bolesnici Odjela za humanu reprodukciju, Klinike za ginekologiju i porodništvo, Kliničkog bolničkog centra u Rijeci. Ispitanici s opstruktivnom AZO (N=2) isključeni su iz studije, pa je ukupan broj ispitanika u studiji 134. Od ukupnog broja ispitanika za kariotipizaciju je bilo do-

stupno njih 86,6% (116/134). Kariotipizacija je provedena na GTG-pruganim preparatima metafaznih kromosoma. Nakon kariotipizacije pet je ispitanika isključeno iz daljnje analize mikrodelecija kromosoma Y zbog nalaza kromosomskih aberacija koje su vjerojatni uzrok neplodnosti: i) Klinefelterov sindrom (N=4) (47,XXY ili 47,XXY/46,XY); ii) recipročna translokacija (N=1) [46,XY,t(11q;22q)].

U istraživanju mikrodelecija kromosoma Y preostalo je 129 ispitanika (neselektirana skupina) među kojima je idiopatska neplodnost utvrđena u 84 ili 65,1% (selektirana skupina). Ispitanici su prije uzimanja uzorka krvi upoznati sa svrhom studije, te su potpisali informirani pristanak. Kliničke dijagnoze ispitanika su AZO (N=33), tOAS (N=25), OAS (N=47) i astenospermija (AS) (N=24). U kontrolnoj je skupini 100 ispitanika, dobrovoljnih davalaca krvi provjerene plodnosti.

Analiza sjemena obavljena je u skladu s uputama Svjetske zdravstvene organizacije<sup>22</sup> (engl. *World Health Organization – WHO*) aparatom UltiMate Sperm Analyzer (Hamilton Thorne Biosciences). Broj spermija smatran je normalnim ukoliko je iznosio  $\geq 20 \times 10^6$ /ml, dok je vrijednost normalne progresivne pokretljivosti spermija iznosila  $\geq 50\%$ . Vrijednosti gonadotropina, ukupnog serumskog testosterona i prolaktina naših ispitanika u kojih nisu pronađene mikrodelecije kromosoma Y objavljene su u prethodnom radu<sup>23</sup>.

### MOLEKULARNO-GENETIČKA ANALIZA MIKRODELECIJA KROMOSOMA Y

Molekularno-genetička analiza provedena je u laboratoriju Zavoda za biologiju i medicinsku genetiku Medicinskog fakulteta u Rijeci. Uzorci krvi dobiveni od ispitanika sadržavali su 3-4ml periferne krvi. Do DNA izolacije krv je zamrznuta u epruvetama s antikoagulansom EDTA (etilendiamintetraoctena kiselina) na temperaturi od  $-20^\circ\text{C}$ . Uzorak DNA je pripremljen iz pune krvi standardnim postupcima. U radu su korištene dvije inačice PCR-a, multipleks i simpleks PCR. U simpleks reakciji umnožen je jedan dio DNA pomoću jednog para DNA početnica, dok se u multipleks reakcijama umnaža više dijelova DNA, te se u reakciji istovremeno rabi nekoliko parova DNA početnica. Pri početnom ispitivanju prisutnosti ili odsutnosti mikrodelecija kromosoma Y, ispituje

**Tablica 1.** STS-biljezi za multipleks i simpleks PCR

**Table 1.** STS- markers for multiplex and simplex PCR

	STS-biljeg	područje kromosoma Y	PCR produkt (pb)
Multipleks A	sY86	AZFa	326
	sY134	AZFb	301
	sY255	AZFc	126
	sY14 (SRY)	Yp	472
	ZFX/ZFY	PAR1	495
Multipleks B	sY84	AZFa	320
	sY127	AZFb	274
	sY254	AZFc	400
	sY14 (SRY)	Yp	472
	ZFX/ZFY	PAR1	495
Multipleks C	sY152	AZFc	125
	sY135	AZFb	253
	sY157	AZFc	285
	ZFX/ZFY	PAR1	495
Multipleks D	sY88	AZFa	123
	sY87	AZFa	252
	ZFX/ZFY	PAR1	495
Simpleks PCR	sY114	AZFb	1450

se 6 STS (engl. *sequence tagged sites*) lokusa biljega koji pokrivaju AZF potpodručja a, b i c. STS su kratki (200-500pb), jedinstveni DNA sljedovi poznatog položaja u genomu. Šest se STS-biljega ispituje dvjema multipleks reakcijama (multipleks-A i multipleks-B) prema shemi prikazanoj u tablici 1. DNA sljedovi početnica objavljeni su u radovima Simoni i sur.<sup>3,24</sup>. Multipleks-A i B reakcije izvedene su u reakcijskom volumenu od 10 $\mu$ l pri sljedećim uvjetima: 50ng svakog DNA uzorka, 1,2x pufer za lančanu reakciju polimeraze, 1,5mM MgCl<sub>2</sub>, 200 $\mu$ mol/l deoksiribonukleozidtrifosfata (dNTP), 0,5 $\mu$ mol/l svakog para početnica i 5U/ $\mu$ l Taq DNA polimeraze. Reakcija je izvedena u uređaju za lančanu reakciju polimeraze (Eppendorf Mastercycler personal). Početna denturacija izvedena je na 94°C 5min. Slijedilo je 30 temperaturnih ciklusa: 94°C 1min, 58°C 1min, 72°C 1min, te završno produljenje lanaca tijekom 10min na 72°C. Elektroforeza PCR produkata izvedena je u 2%-tnom agaroznom gelu uz dodatak etidij bromida (0,1mg/ml), pri 80 V i 2 A. U specifičnoj analizi mikrodelecija kromosoma Y, na mikrodeleciju upućuje nedostatak jednog ili više PCR produkata multipleks reakcija. Radi sigurnosti nalaza, prilikom izvođenja elektroforeze koristili smo pozitivnu i negativnu kontrolu. Negativnu kontrolu činila je PCR smjesa u koju prije početka reakcije nismo dodali DNA uzorak, te je izostala amplifikacija. Pozitivnu kontrolu činio je lokus ZFX/ZFY (engl. *zinc finger protein*), lokus u pseudoautosomnom području koji daje pozitivan signal u muškaraca i žena. Dodatno su, prilikom izvođenja multipleks PCR-a, kao negativna i pozitivna kontrola korištene DNA žene i DNA muškarca u kojega je dokazana odsutnost mikrodelecija kromosoma Y. Prilikom PCR-a s DNA uzorkom žene amplificira se i daje pozitivan signal jedino lokus ZFX/ZFY. U muškarca bez prisutnih mikrodelecija amplificiraju se svi STS lokusi biljezi, kao i ZFX/ZFY lokus. Ukoliko je multipleks reakcijama A i B utvrđena mikrodelecija AZF područja, dodatno je potvrđena s barem tri simpleks PCR-a u kojima je izostala amplifikacija STS-biljega koji se prethodno nije amplificirao u multipleks reakciji. Tek je nakon uzastopnih negativnih rezultata simpleks reakcije potvrđena mikrodelecija specifičnoga STS-lokusa biljega. Pozitivan rezultat amplifikacije svih ispitanih STS lokusa multipleks-A i B reakcija-

ma upućuje na nepostojanje mikrodelecija kromosoma Y sa 95%-tnom sigurnošću, odnosno, postoji vrlo velika vjerojatnost da mikrodelecije kromosoma Y nisu prisutne u ispitanika. U slučaju mikrodelecija otkrivenih multipleks reakcijama A i B, uslijedila je analiza dodatnih STS-biljega radi utvrđivanja opsega mikrodelecije. Tom smo dodatnom analizom testirali granice AZFa, b i c područja. U tu svrhu izabrali smo novih šest STS-biljega (po dva u svakom AZF potpodručju), dizajnirali multipleks reakcije C i D, te koristili jedan simpleks PCR. Prilikom biranja STS-bi-

Mikrodelecije AZF-područja kromosoma Y najčešće su udružene s teškim oblikom oligoastenospemije (tOAS) i azoospermijom (AZO) (potpunom odsutnošću spermija u ejakulatu). U kandidata za IVF/ICSI indicirana je molekularno-genetička analiza mikrodelecija kromosoma Y zbog 100%-tnog rizika za prenošenje mikrodelecije na muško potomstvo. Mikrodelecije najčešće nastaju *de novo* tijekom gametogeneze, iako su opisani i slučajevi prenošenja prirodnim putem.

ljava i dizajniranja novih multipleks reakcija vodili smo računa o duljini lanaca očekivanih PCR produkata kako bismo ih mogli razdvojiti elektroforezom. Multipleks-C i D reakcije također su izvedene u reakcijskom volumenu od 10 $\mu$ l pri istim uvjetima kao multipleks-A i B PCR. Simpleks PCR izveden je pri sljedećim uvjetima: 1x pufer za lančanu reakciju polimeraze, 1,5mM MgCl<sub>2</sub>, 200 $\mu$ mol/l deoksiribonukleozidtrifosfata (dNTP), 0,5 $\mu$ mol/l svakog para početnica i 5U/ $\mu$ l Taq DNA polimeraze. STS-biljezi rabljeni u multipleks-C i D reakcijama navedeni su u tablici 1, dok su sljedovi DNA početnica dodatne molekularno-genetičke analize prikazani u tablici 2.

## REZULTATI

Vodeći uzroci neplodnosti u neselektiranom uzorku ispitanika (N=129) su varikokela (16,3%) i kriptorhizam (12,4%), te u manjoj mjeri hipogonadizam (4,6%), prostatitis (3,9%) i preponska kila (3,9%). Hipogonadizam je u velikoj mjeri povezan s AZO (15,2%), a kriptorhizam s tOAS (24,0%). Varikokela se učestalo nađe u svim skupinama (od



AS do AZO: 8,0-18,2%). Učestalost idiopatske neplodnosti u našem uzorku iznosi 84/129 ili 65,1%.

#### REZULTATI MULTIPLEKS-A I B REAKCIJA

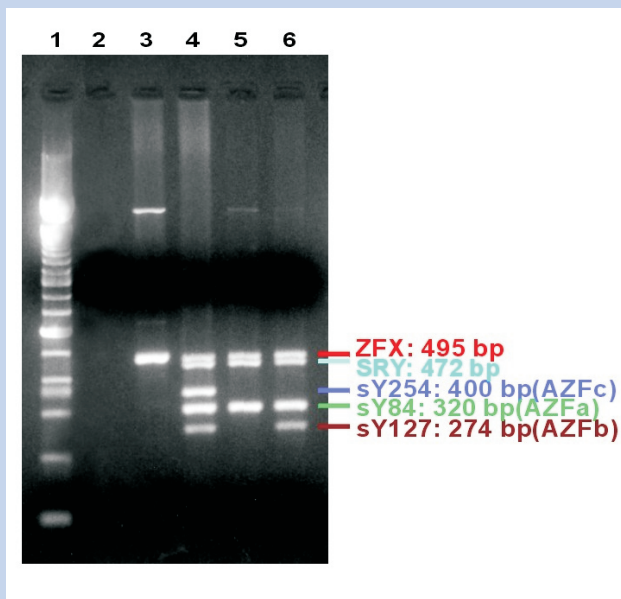
Analizom mikrodelecija kromosoma Y u 127 muškaraca umanjene plodnosti utvrdili smo njihovu prisutnost u dvojice ispitanika (M124 i M125), a nisu pronađene u kontroli. Oba ispitanika s mikrodelecijom su u skupini s kliničkom dijagnozom AZO, te idiopatskom neplodnosti. U ispitanika M124 pronašli smo mikrodelecije obaju STS-lokusa biljega AZFb (sY127 i sY134) i AZFc potpodručja (sY254 i sY255), što upućuje na AZFb+c model mikrodelecije. U ispitanika M125 mikrodelecije su otkrivene jedino unutar AZFc potpodručja kro-

mosoma Y (negativni sY254 i sY255). Rezultate multipleks-A i B reakcija i prisutnost mikrodelecija u dvojice ispitanika prikazuju slike 2 i 3.

#### REZULTATI MULTIPLEKS-C I D REAKCIJE, TE SIMPLEKS PCR-a

Sveukupni rezultati molekularno-genetičke analize mikrodelecija kromosoma Y prikazani su u tablici 3. Multipleks-C lančana reakcija polimeraze pokazala je prisutnost STS-lokusa biljega sY135 (AZFb), te odsutnost sY152 i sY157 (AZFc) u obojice ispitanika s prethodno utvrđenim mikrodelecijama.

Multipleks-D lančana reakcija polimeraze pokazala je prisutnost obaju STS-lokusa biljega na granici

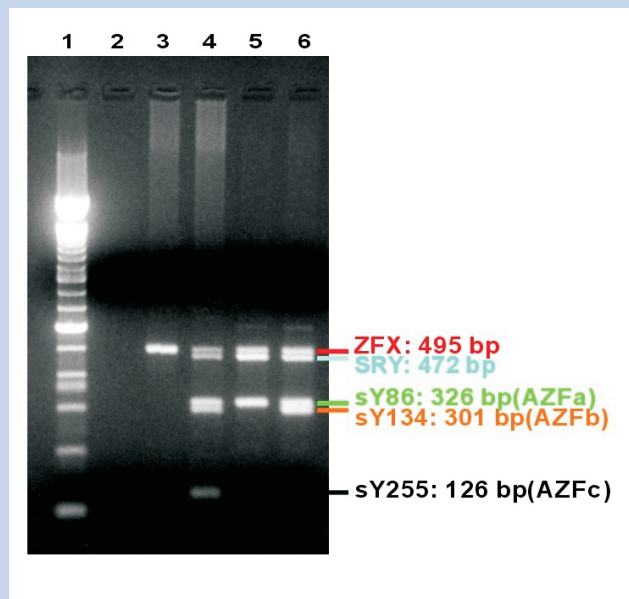


**Slika 2.** Prikaz multipleks-A reakcije u kontrolnih ispitanika i dvojice ispitanika s mikrodelecijama kromosoma Y

**Figure 2.** The results of multiplex-A PCR in control subjects and two men with chromosome Y microdeletions

#### Legenda:

- jažica 1: 100 pb marker
- jažica 2: negativna kontrola (bez DNA)
- jažica 3: negativna kontrola – DNA žene
- jažica 4: pozitivna kontrola – DNA muškarca bez mikrodelecija kromosoma Y
- jažica 5: ispitanik M124 – mikrodelecije u AZFb i AZFc području (negativni STS-biljezi sY127 i sY254; pozitivan STS-biljeg sY84 u AZFa)
- jažica 6: ispitanik M125 – mikrodelecije u AZFc području (negativan STS-biljeg sY254; pozitivni STS-biljezi sY84 – AZFa i sY127- AZFb)



**Slika 3.** Prikaz multipleks-B reakcije u kontrolnih ispitanika i dvojice ispitanika s mikrodelecijama kromosoma Y

**Figure 3.** The results of multiplex-B PCR in control subjects and two men with chromosome Y microdeletions

#### Legenda:

- jažica 1: 100 pb marker
- jažica 2: negativna kontrola (bez DNA)
- jažica 3: negativna kontrola – DNA žene
- jažica 4: pozitivna kontrola – DNA muškarca bez mikrodelecija kromosoma Y
- jažica 5: ispitanik M124; mikrodelecije u AZFb i AZFc (negativni STS-biljezi sY134 i sY255; pozitivan STS-biljeg sY86 u AZFa)
- jažica 6: ispitanik M125 – mikrodelecije u AZFc (negativan STS-biljeg sY255; pozitivni STS-biljezi sY86 – AZFa i sY134 u AZFb)

**Tablica 2.** Slijed DNA početnica korištenih u multipleks C i D reakcijama, te simpleks PCR-u i očekivana duljina lanaca PCR produkata (pb)**Table 2.** DNA primer sequences used in multiplex-C and D, and simplex PCR, and expected PCR products' length (bp)

STS lokus	Raspored početnih oligonukleotida
ZFY	F: 5' - ACC RCT GTA CTG ACT GTG ATT ACA C - 3' R: 5' - GCA CYT CTT TGG TAT CYG AGA AAG T - 3'
sY87	F 5' - TCT GTT GCT TGA AAA GAG GG -3' R 5' - ACT GCA GGA AGA ATC AGC TG- 3'
sY88	F 5' - TTG TAA TCC AAA TAC ATG GGC -3' R 5' - CAC CCA GCC ATT TGT TTT AC- 3'
sY135	F 5' - CAT TTC CAC ATT ATG ATA ATT ATG C-3' R 3' - ACC CAG AGA GTA GAA ACA GTG C -3'
sY114	F 5' - TGC ACT CAT GGA GAC AAC AG -3' R 5' - AAC CAG GGT TTT CAC TGA AA -3'
sY152	F 5' - AAG ACA GTC TGC CAT GTT TCA -3' R 3' - ACA GGA GGG TAC TTA GCG GT -3'
sY157	F 5' - CTT AGG AAA AAG TGA AGC CG -3' R 3 - CCT GCT GTC AGC AAG ATA CA -3'

AZFa prema AZFb: sY87 i sY88 u obojice ispitanika (M124 i M125), kao i u kontrolnih muškarca. Rezultati potvrđuju da u ispitanika u kojih smo prethodnim multipleks reakcijama utvrdili mikrodelecije AZFb i AZFb+c potpodručja najvjerojatnije posjeduju intaktno AZFa potpodručje, odnosno, AZFa nije zahvaćeno mikrodelecijama niti u jednog ispitanika. PCR analizom STS-lokusa biljega sY114 u AZFb potpodručju kromosoma Y utvrđena je mikrodelecija u ispitanika M124, dok mikrodelecije nije bilo u ispitanika M125 (tablica 3).

#### UČESTALOST MIKRODELECIJA AZF PODRUČJA KROMOSOMA Y

Molekularnom analizom mikrodelecija kromosoma Y u neselektiranoj skupini od 129 muškarca umanjene plodnosti pronašli smo dvojicu ispitanika s mikrodelecijama AZF područja (2/129 ili 1,55%) (tablica 4). Klinička dijagnoza obojice ispitanika je idiopatska AZO. Mikrodelecije nismo pronašli u ispitanika s drugim dijagnozama. Slijedi da je učestalost mikrodelecija u selektiranoj skupini ispitanika s neplodnošću nepoznata uzroka 2/84 ili 2,38% (tablica 4). Ukoliko u obzir uzmemo samo ispitanike s teškim poremećajem spermatogeneze (AZO i tOAS), učestalost mikrodelecija iznosi 3,6% (2/56). U ispitanika s AZO i OAS

**Tablica 3.** Rezultati molekularne analize AZF područja kromosoma Y**Table 3.** The results of the molecular-genetic analysis of Y-chromosome AZF region

	STS lokus	Ispitanik M124	Ispitanik M125
Yp	sY14 (SRY)	+	+
	ZFY	+	+
AZFa	sY86	+	+
	sY84	+	+
	sY87	+	+
	sY88	+	+
AZFb	sY114	-	+
	sY127	-	+
	sY134	-	+
	sY135	+	+
AZFc	sY152	-	-
	sY254	-	-
	sY255	-	-
	sY157	-	-

učestalost je AZF mikrodelecija 1,9% (2/105), a u slučaju idiopatske AZO i OAS 3,1% (2/64). Učestalost mikrodelecija samo u skupini ispitanika s AZO iznosi 2/33 ili 6,06%. Ukoliko iz analize izuzmemo sve ispitanike s AZO koji imaju neke druge moguće uzroke neplodnosti, poput varikokele, kriptorhizma i drugih (N=15), dolazimo do učestalosti mikrodelecija AZF područja kromosoma Y od 2/18 ili 11,1% u skupini muškaraca s idiopatskom neplodnosti i potvrđenom AZO.

S obzirom na pozitivan rezultat molekularne analize dodatnih STS-lokusa biljega AZFa područja i negativan rezultat analize dodatnih STS-lokusa biljega u AZFc na granici prema heterokromatinskom području, može se zaključiti da mikrodelecije u dvojice ispitanika u našem uzorku odgovaraju modelima AZFc i AZFb+c mikrodelecija, te ne zahvaćaju AZFa potpodručje kromosoma Y.

#### RASPRAVA

Mikrodelecije AZF područja kromosoma Y udružene su s teškim poremećajima spermatogeneze. Mikrodelecija unutar AZFa ili AZFb potpodručja ili koja se proteže kroz AZFb+c uklanja dio gena esencijalnih za spermatogenezu i praktično znači nemogućnost pronalaska zrelih spermija tijekom testikularne ekstrakcije. Iz tih se razloga mikrodelecije kromosoma Y uglavnom nađu u muškaraca s AZO ili brojem spermija u ejakulatu manjim od  $1 \times 10^6$ /ml. Muškarci s poremećajem broja i/ili pokretljivosti spermija jesu kandidati za *in vitro* (engl. *in vitro fertilization* – IVF) ili ICSI metode

potpomognute oplodnje. Osim kromosomske analize kojom se utvrđuju kromosomske promjene udružene s poremećajem spermatogeneze i mogući rizik za kromosomske anomalije u potomstva, u kandidata za IVF/ICSI indicirana je molekularno-genetička analiza mikrodelecija kromosoma Y zbog 100%-tnog rizika za prenošenje mikrodelecije na muško potomstvo. Mikrodelecije najčešće nastaju *de novo* tijekom gametogeneze, iako su opisani i slučajevi prenošenja prirodnim putem<sup>19,25,26</sup>. Sinovi neplodnih muškaraca s mikrodelecijom AZF područja također će biti neplodni<sup>25,27,28</sup>, pa je u slučaju pronalaska mikrodelecije neophodno genetičko informiranje prije izvođenja metode ICSI. Zabilježeno je i povećanje opsega mikrodelecije pri prijenosu iz jedne generacije u drugu<sup>25,26</sup>. Genetičko informiranje je indicirano i zbog činjenice da rekombinacijski događaji na kromosomu Y znače i kromosomsku nestabilnost, pa prisutnost mikrodelecija kromosoma Y upućuje na rizik od gubitka čitavoga kromosoma tijekom gametogeneze, stvaranja spermija nulisomičnih za spolni kromosom Y, i posljedično kromosomske konstitucije 45,X0 ili kromosomskog mozaicizma nakon oplodnje (rizik za spontani pobačaj ili pojavu abnormalnog spolovila). Budući da mikrodelecije kromosoma Y mogu uzrokovati nestabilnost toga kromosoma i njegov gubitak u dijelu stanica, nalaz stanične linije 45,X0 pored normalne 46,XY tijekom kariotipizacije može upućivati na prisutnost mikrodelecija. Neki autori preporučuju višebojnu FISH-analizu na somatskim, a po mo-

**Tablica 4.** Kliničke dijagnoze ispitanika i učestalost mikrodelecija kromosoma Y

**Table 4.** Clinical diagnoses of subjects in the study and the frequency of Y-chromosome microdeletions

	azoospermija N=33		teški oblik oligoasteno- spermije N=25		oligo- astenospermija N=47		normoasteno- spermija N=24		UKUPNO	
	N	%	N	%	N	%	N	%	N	%
neidiopatska nepl. <sup>a</sup>	15	45,5	9	36,0	15	31,9	6	25,0	45	34,9
mikrodelecije	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
idiopatska nepl.	18	54,5	16	64,0	32	68,1	18	75,0	84	65,1
mikrodelecije	2	11,1	-	-	-	-	-	-	2	2,4

<sup>a</sup> ispitanici s kliničkim dijagnozama varikokele, kriptorhizma, hipogonadizma, prostatitisa, preponske kile ili kombinacije dijagnoza



gućnosti i germinativnim stanicama u svrhu detekcije gonadnog mozaicizma u bolesnika s mikrodelecijama koji se žele podvrgnuti metodi potpomoćne reprodukcije ICSI. Povezano s izvođenjem ICSI-ja, predlaže se i preimplantacijska genetička dijagnoza za otkrivanje aberacija Y kromosoma<sup>29</sup>. Problem u našoj analizi mikrodelecija je u činjenici da niti jedan od ispitanika u kojih smo molekularno-genetičkom analizom otkrili mikrodelecije nije bio dostupan za kromosomsku analizu. Zbog toga ne možemo isključiti mogućnost postojanja strukturnih promjena kromosoma Y u dvojice ispitanika (primjerice delecije dijela Yq kraka).

Analizom rezultata brojnih autora uočava se da su mikrodelecije kontinuirane, te da obično zahvaćaju niz susjednih lokusa unutar pojedinog AZF potpodručja ili se kontinuirano protežu preko dva ili više potpodručja (od AZFa do AZFc regije)<sup>15,30,31</sup>. Opisani su i slučajevi u kojima su mikrodelecije diskontinuirane: uz veću mikrodeleciju u AZFc otkriveni su deletirani pojedinačni lokusi u potpodručju AZFa<sup>32</sup>, odnosno, utvrđene su delecije nesusednih STS markera unutar AZFb i c potpodručja<sup>4,20,33</sup>. U nastojanju da se što preciznije procijeni opseg mikrodelecija AZF područja kromosoma Y, dosad je opisana molekularna analiza velikog broja STS-biljega. Uporaba velikog broja STS-biljega za detekciju mikrodelecija nije se, međutim, pokazala pretjerano korisnom, budući da bi barem neki od STS-lokusa biljega mogli biti polimorfne varijante. Stoga su Simoni i sur.<sup>3</sup> preporučili STS-biljege za korištenje prilikom analize opsega mikrodelecija. U ovom smo istraživanju nastojali utvrditi opseg mikrodelecija testirajući 6 dodatnih STS-lokusa biljega (po dva u svakom AZF području, prema preporuci EAA) smještenih proksimalno i distalno prema granicama pojedinih potpodručja. Iako je analiza 6 dodatnih STS-biljega (sY87, sY88, sY135, sY114, sY152, sY157) možda nedostatna za stjecanje potpunog uvida u opseg mikrodelecija AZF područja, vrlo je vjerojatno da AZFa područje možemo u potpunosti isključiti u obojice naših ispitanika (sva četiri STS-biljega dala su pozitivnu PCR reakciju). Dodatna molekularno-genetička analiza upućuje da je mikrodelecija u ispitanika M124 koja se proteže kroz AZFb+c diskontinuirana, dok je AZFc pot-

područje vjerojatno u potpunosti izgubljeno u oba ispitanika (negativni su rubni lokusi sY152 i sY157, kao i oba biljega gena DAZ (engl. *Deleted in Azoospermia*) (sY254, sY255). Gen DAZ je testis-specifičan, izražen u spermatogonijama i na kromosomu Y prisutan s četiri kopije. Vjeruje se da ima ulogu u najranijim stupnjevima spermatogeneze ili čak ranije u održavanju populacije germinativnih stanica<sup>34</sup>. Produkt gena je RNA-vezni protein (engl. *RNA-binding protein*). S obzirom na strukturu AZFc potpodručja opisane su mikrodelecije koje nastaju rekombinacijom između amplikona b2 i b4 (palindromi P1 i P3), čime se ukloni 3,5Mb, 21 kopija gena i transkripcijskih jedinica, uključujući sve četiri kopije gena DAZ<sup>3,35</sup>.

U slučaju homologne rekombinacije između amplikona b2 i b3 uklone se samo dvije kopije DAZ gena (*gr/gr delecija*)<sup>21</sup>. Povezanost *gr/gr* delecije s neplodnošću se još istražuje. Opažena je u muškaraca s vrlo varijabilnim brojem spermija u ejakulatu, odnosno ne povezuje se isključivo s tOAS ili AZO. Lynch i sur.<sup>36</sup> su uočili povezanost *gr/gr* mikrodelecije s umanjenom plodnošću u australskoj populaciji, te preporučili njezinu analizu tijekom rutinske obrade neplodnih muškaraca.

Usporedimo li učestalost mikrodelecija utvrđenih u našem uzorku s učestalošću mikrodelecija u neplodnih muškaraca objavljenom u literaturi (~6-7%), uočava se da je učestalost mikrodelecija u skupini naših muškaraca znatno niža (2,38%). Taj se rezultat može usporediti s rezultatom Medice i sur.<sup>37</sup> koji su u skupini neselektiranih muškaraca umanjene plodnosti Istarske županije pronašli mikrodelecije AZF područja kromosoma Y samo u jednoga ispitanika (0,95%). Ipak, u muškaraca koji imaju idiopatsku nepodnost i AZO, rizik za mikrodelecije znatno je viši i iznosi 11,1%. Sukladno našim rezultatima, testiranje na prisutnost mikrodelecija AZF područja kromosoma Y neophodno je u azoospermičnih muškaraca s idiopatskom neplodnošću. Isti rezultat dobili su u korejskoj populaciji Lee i sur.<sup>38</sup> u čijoj je skupini s idiopatskom AZO učestalost mikrodelecija iznosila također 11,1% (testirali su 60 STS-lokusa biljega), što upućuje na povezanost mikrodelecije Y-kromosoma i idiopatske AZO. Također je neophodno povećati uzorak ispitanika kako bi se mogla odrediti učestalost mikrodelecija kromosoma Y u

osoba s tOAS u našoj populaciji. Prvi podaci o učestalosti Y-mikrodelecija u hrvatskoj populaciji objavljeni su 2001. godine za skupinu azoospermičnih muškaraca (3/67 ili 4,5%)<sup>39</sup>, međutim, autori nisu opisali klinička obilježja ispitanika niti model pronađenih mikrodelecija. U drugim europskim populacijama utvrđene su više učestalosti Y-mikrodelecija u skupinama s AZO i OAS negoli u našoj. Prednjače danska<sup>40</sup> (17% u idiopatskoj neplodnosti), španjolska<sup>41</sup> (14%), francuska<sup>42</sup> (10-15% u AZO i 5-10% u OAS), finska<sup>43</sup> i talijanska<sup>44</sup> (9,0%, odnosno 4,9% u AZO+tOAS). Sličan rezultat našem (3,1%) objavljen je za idiopatsku AZO i OAS u irskoj<sup>45</sup> i njemačkoj<sup>6</sup> populaciji (3,6% u obje), a nešto je viša učestalost utvrđena u slovenskoj populaciji<sup>46</sup> (4,4%, odnosno 5,1% u idiopatskim AZO+OAS). U populacijama Azije najviše su učestalosti Y-mikrodelecija utvrđene u Japanaca<sup>47</sup> (10-15,7%), a vrlo visoke u idiopatskoj AZO+OAS (25,9% u Japanaca<sup>20</sup> i 19,4% u Kineza<sup>48</sup>). U Indijaca učestalost Y-mikrodelecija varira od 4-5,8% u AZO+OAS<sup>4,21,49,50</sup>, a u Tajlandana iznosi 4,6%<sup>7</sup>. Sličan je postotak Y-mikrodelecija objavljen u populaciji Novog Zelanda<sup>33</sup> (5,1% u AZO+OAS), dok je visoka učestalost Y-mikrodelecija objavljena u Brazilaca s idiopatskom AZO i tOAS (28/63 ili 44,4%)<sup>51</sup>.

Naša studija, poput prethodne studije Medice i sur.<sup>37</sup> napravljene u neselektiranoj skupini neplodnih muškaraca Istarske županije, upućuje na nižu učestalost mikrodelecija AZF područja kromosoma Y u populaciji muškaraca umanjene plodnosti na području sjeverozapadne Hrvatske u odnosu prema drugim europskim populacijama (3,0% u idiopatskoj AZO+OAS, 1,9% u svih AZO+tOAS+OAS). Jedan od razloga pronađene niske učestalosti Y-mikrodelecija u našoj testiranoj skupini mogao bi biti malen broj ispitanika s kliničkom dijagnozom AZO (N=33) u studiji, te malen broj ispitanika s brojem spermija  $<1 \times 10^6$  u ml ejakulata (N=4). Drugi mogući razlog je genetičko nasljeđe kromosoma Y, odnosno prisutnost specifičnih Y-haplogrupa koje bi mogle predstavljati podložnost za pojavu mikrodelecija s posljedičnim negativnim učinkom na spermatogenezu ili pak taj rizik umanjiti. Istraživanja Y-haplogrupa postala su zanimljiva s obzirom na neriješeno pitanje neplodnosti u mnogih muškaraca

s idiopatskom neplodnošću koji nemaju Y-mikrodelecije. Novije spoznaje upućuju na potrebu istraživanja strukturnih varijacija kromosoma Y (mikrodelecija, ali i drugih varijacija) koje bi mogle predstavljati rizik za poremećaj spermatogeneze<sup>2,52-54</sup>.

## LITERATURA

1. Escalier D. Impact of genetic engineering on the understanding of spermatogenesis. *Hum Reprod Update* 2001;7:191-210.
2. Vogt PH. Molecular genetics of human male infertility: from genes to new therapeutic perspectives. *Curr Pharm Des* 2004;10:471-500.
3. Simoni M, Bakker E, Krausz C. EAA/EMQN best practice guidelines for molecular diagnosis of Y-chromosomal microdeletions. State of the art 2004. *Int J Androl* 2004;27:240-9.
4. Rao L, Babu A, Kanakavalli M, Padmalatha V, Singh A, Singh PK et al. Chromosomal abnormalities and Y chromosome microdeletions in infertile men with varicocele and idiopathic infertility of South Indian origin. *J Androl* 2004;25:147-53.
5. Radojčić Badovinac A, Buretić-Tomljanović A, Starčević N, Kapović M, Vlastelić I, Randić L. Chromosome studies in patients with defective reproductive success. *Am J Reprod Immunol* 2000;44:279-83.
6. Maurer B, Simoni M. Y chromosome microdeletion screening in infertile men. *J Endocrinol Invest* 2000;23:664-70.
7. Vutyavanich T, Piromlertamorn W, Sirirungsri W, Sirisukkasem S. Frequency of Y chromosome microdeletions and chromosome abnormalities in infertile Thai men with oligozoospermia and azoospermia. *Asian J Androl* 2007;9:68-75.
8. Tiepolo L, Zuffardi O. Localization of factors controlling spermatogenesis in the nonfluorescent portion of the human Y chromosome long arm. *Hum Genet* 1976;34:119-24.
9. Quintana-Murci L, Fellous M. The Human Y Chromosome: The Biological Role of a "Functional Wasteland". *J Biomed Biotechnol* 2001;1:18-24.
10. Cram DS, Osborne E, McLachlan RI. Y chromosome microdeletions: implications for assisted conception. *Med J Aust* 2006;185:433-4.
11. Delbridge ML, Lingenfelter PA, Distechi CM, Graves JA. The candidate spermatogenesis gene RBMY has a homologue on the human X chromosome. *Nat Genet* 1999;22:223-4.
12. Bachtrog D, Charlesworth B. Towards a complete sequence of the human Y chromosome. *Genome Biol* [Internet]. 2001;2:1016.1-1016.5. Available at <http://genomebiology.com/2001/2/5/reviews/1016.5>. Accessed October 5<sup>th</sup>, 2008.
13. Tsujimura A, Fujita K, Komori K, Tanjapatkul P, Miyagawa Y, Takada S et al. Associations of homologous RNA-binding motif gene on the X chromosome (RBMX) and its like sequence on chromosome 9 (RBMXL9) with non-obstructive azoospermia. *Asian J Androl* 2006;8:213-8.

14. Skaletsky H, Kuroda-Kawaguchi T, Minx PJ, Cordum HS, Hilliert L, Brown LG et al. The male-specific region of the human Y chromosome is a mosaic of discrete sequence classes. *Nature* 2003;423:825-37.
15. Ferlin A, Moro E, Rossi A, Dallapicola B, Foresta C. The human Y chromosome's azoospermia factor b (AZFb region): sequence, structure, and deletion analysis in infertile men. *J Med Genet* 2003;40:18-24.
16. Blagosklonova O, Fellmann F, Clavequin MC, Roux C, Bresson JL. AZFa deletion in Sertoli cell-only syndrome: a retrospective study. *Mol Hum Reprod* 2000;6:795-9.
17. Schlegel PN. The Y chromosome. *Reprod Biomed Online* 2002;5:22-5.
18. Hopps CV, Mielnik A, Goldstein M, Palermo GD, Rosenwaks Z, Schlegel PN. Detection of sperm in men with Y chromosome microdeletions of the AZFa, AZFb and AZFc regions. *Hum Reprod* 2003;18:1660-5.
19. McElreavey K, Ravel C, Chantot-Bastaraud S, Siffroi JP. Y chromosome variants and male reproductive function. *Int J Androl* 2006;29:298-303.
20. Fujisawa M, Shirakawa T, Kanzaki M, Okada H, Arakawa S, Kamidono S. Y-chromosome microdeletion and phenotype in cytogenetically normal men with idiopathic azoospermia. *Fertil Steril* 2001;76:491-5.
21. Mitra A, Dada R, Kumar R, Gupta NP, Kucheria K, Gupta SK. Screening for Y-chromosome microdeletions in infertile Indian males: utility of simplified multiplex PCR. *Indian J Med Res* 2008;127:124-32.
22. World Health Organisation Laboratory Manual for the Examination of Human Semen and Semen-Cervical Mucus Interaction, 4th ed. Cambridge University Press, Cambridge 1999.
23. Buretić-Tomljanović A, Vlastelić I, Radojčić Badovinac A, Starčević Čizmarević N, Nadalin S, Ristić S. The impact of hemochromatosis mutations and transferrin genotype on gonadotropin serum levels in infertile men. *Fertil Steril* doi: 10.1016/j.fertnstert.2008.02.129.
24. Simoni M. Molecular diagnosis of Y chromosome microdeletions in Europe: State-of-the-art and quality control. *Hum Reprod* 2001;16:402-9.
25. Rolf C, Gromoll J, Simoni M, Nieschlag E. Natural transmission of a partial AZFb deletion of the Y chromosome over three generations: case report. *Hum Reprod* 2002;17:2267-71.
26. Kühnert B, Gromoll J, Kostova E, Tschanter P, Luetjens CM, Simoni M, Nieschlag E. Case report: natural transmission of an AZFc Y-chromosomal microdeletion from father to his sons. *Hum Reprod* 2004;19:886-8.
27. Komori S, Kato H, Kobayashi S, Koyama K, Isojima S. Transmission of Y chromosomal microdeletions from father to son through intracytoplasmic sperm injection. *J Hum Genet* 2002;47:465-8.
28. Oates RD, Silber S, Brown LG, Page DC. Clinical characterization of 42 oligospermic or azospermic men with microdeletion of the AZFc region of the Y chromosome, and of 18 children conceived via ICSI. *Hum Reprod* 2002;17:2813-24.
29. Siffroi JP, Le Bourhis C, Krausz C, Barboux S, Quintana-Murci L, Kanafani S et al. Sex chromosome mosaicism in males carrying Y chromosome long arm deletions. *Hum Reprod* 2000;15:2559-62.
30. Reijo R, Lee TY, Salo P, Alagappan R, Brown LG, Rosenberg M et al. Diverse spermatogenic defects in humans caused by Y chromosome deletions encompassing a novel RNA-binding protein gene. *Nat Genet* 1995;10:383-93.
31. Repping S, Van Daalen SK, Korver CM, Brown LG, Marszalek JD, Gianotten J et al. A family of human Y chromosomes has dispersed throughout northern Eurasia despite a 1.8-Mb deletion in the azoospermia factor c region. *Genomics* 2004;83:1046-52.
32. Thangaraj K, Gupta NJ, Pavani K, Reddy AG, Subramanian S, Rani DS et al. Y Chromosome deletion in Azoospermic men in India. *J Androl* 2003;24:588-97.
33. Kerr NJ, Zhang J, Sin FY, Benny P, Sin IL. Frequency of microdeletions in the azoospermia factor region of the Y-chromosome of New Zealand men. *N Z Med J* 2000;113:468-70.
34. Reijo RA, Dorfman DM, Slee R, Renshaw AA, Loughlin KR, Cooke H et al. DAZ family proteins exist throughout male germ cell development and transit from nucleus to cytoplasm at meiosis in humans and mice. *Biol Reprod* 2000;63:1490-6.
35. Saxena R, De Vries JW, Repping S, Alagappan RK, Skaletsky H, Brown LG et al. Four DAZ genes in two clusters found in the AZFc region of the human Y chromosome. *Genomics* 2000;67:256-67.
36. Lynch M, Cram DS, Reilly A, O'Brian MK, Baker HW, De Kretser DM et al. The Y chromosome gr/gr subdeletion is associated with male infertility. *Mol Hum Reprod* 2005;11:507-12.
37. Medica I, Gligorievska N, Prenc M, Peterlin B. Y microdeletions in the Istria county, Croatia. *Asian J Androl* 2005;7:213-6.
38. Lee YH, Kim T, Kim MH, Kim YT, Kim SH. Y chromosome microdeletions in idiopathic azoospermia and non-mosaic type of Klinefelter syndrome. *Exp Mol Med* 2000;32:231-4.
39. Sertić J, Cvitković P, Myers A, Saiki RK, Stavljenić Rukavina A. Genetic markers of male infertility: Y chromosome microdeletions and cystic fibrosis transmembrane conductance gene mutations. *Croat Med J* 2001;42:416-20.
40. Krausz C, Rajpert-De Meyts E, Frydelund-Larsen L, Quintana-Murci L, McElreavey K, Skakkebaek NE. Double-blind Y chromosome microdeletion analysis in men with known sperm parameters and reproductive hormone profiles: microdeletions are specific for spermatogenic failure. *J Clin Endocrinol Metab* 2001;86:2638-42.
41. Martinez MC, Bernabe MJ, Gomez E, Ballesteros A, Landeras J, Glover G et al. Screening for AZF deletion in a large series of severely impaired spermatogenesis patients. *J Androl* 2000;21:651-5.
42. Akinin-Seifer IE, Lejeune H, Touraine RL, Levy R. Y chromosome microdeletion screening in infertile men in France: a survey of French practice based on 88 IVF centres. *Hum Reprod* 2004;19:788-93.
43. Aho M, Harkonen K, Suikkari AM, Juvonen V, Antilla L, Lahdetie J. Y-chromosomal microdeletions among infertile Finnish men. *Acta Obstet Gynecol Scand* 2001;80:652-6.
44. Ferlin A, Arredi B, Speltra E, Cazzadore C, Selice R, Garolla A et al. Molecular and clinical characterization of Y chro-

- mosome microeletions in infertile men: a 10-year experience in Italy. *J Clin Endocrinol Metab* 2007;92:762-70.
45. Friel A, Houghton JA, Maher M, Smith T, Noel S, Nolan A et al. Molecular detection of Y chromosome microdeletions: an Irish study. *Int J Androl* 2001;24:31-6.
46. Peterlin B, Kunej T, Sinkovec J, Gligorievska N, Zorn B. Screening for Y chromosome microdeletions in 226 Slovenian subfertile men. *Hum Reprod* 2002;17:17-24.
47. Nakashima M, Koh E, Namiki M, Yoshida A. Multiplex sequence-tagged site PCR for efficient screening of microdeletions in Y chromosome in infertile males with azoospermia or severe oligozoospermia. *Arch Androl* 2002;48:351-8.
48. Song NH, Wu HF, Zhang W, Zhuo ZM, Qian LX, Hua LX et al. Screening for Y chromosome microdeletions in idiopathic and nonidiopathic infertile men with varicocele and cryptorchidism. *Chin Med J (Engl)* 2005;118:1462-7.
49. Babu SR, Swarna M, Padmavathi P, Reddy PP. PCR analysis of Yq microdeletions in infertile males, a study from South India. *Asian J Androl* 2002;4:265-8.
50. Dada R, Gupta NP, Kucheria K. Molecular sreening for Yq microdeletion in men with idiopathic oligozoospermia and azoospermia. *J Biosci* 2003;28:163-8.
51. Arruda JT, Bordin BM, Santos PR, Mesquita WE, Silva RC, Maia MC et al. Y chromosome microdeletions in Brazilian fertility clinic patients. *Genet Mol Res* 2007;6:461-9.
52. Krausz C, Quintana-Murci L, Rajpert-de Meyts E, Jørgensen N, Joblinq MA, Rosser ZH et al. Identification of a Y chromosome haplogroup associated with reduced sperm counts. *Hum Mol Genet* 2001;10:1873-7.
53. Vogt PH. AZF deletions and Y chromosomal haplogroups: history and update based on sequence. *Hum Reprod Update* 2005;11:319-36.
54. Yang Y, Ma M, Li L, Zhang W, Chen P, Ma J et al. Y chromosome haplogroups may confer susceptibility to partial AZFc deletions and deletion effect on spermatogenesis impairment. *Hum Reprod* 2008;23:2167-72.