



MD 1489 Y 2021.01.31

REPUBLICA MOLDOVA



(19) Agenția de Stat
pentru Proprietatea Intelectuală

(11) **1489** (13) **Y**
(51) Int.Cl: *A61B 10/00* (2006.01)
C12N 15/00 (2006.01)
C12Q 1/6806 (2018.01)
C12Q 1/6865 (2018.01)
C12Q 1/6883 (2018.01)

**(12) BREVET DE INVENȚIE
DE SCURTĂ DURATĂ**

În termen de 6 luni de la data publicării mențiunii privind hotărârea de acordare a brevetului de invenție de scurtă durată, orice persoană poate face opoziție la acordarea brevetului	
(21) Nr. depozit: s 2020 0066 (22) Data depozit: 2020.06.19	(45) Data publicării hotărârii de acordare a brevetului: 2021.01.31, BOPI nr. 1/2021
(71) Solicitant: UNIVERSITATEA DE STAT DE MEDICINĂ ȘI FARMACIE "NICOLAE TESTEMIȚANU" DIN REPUBLICA MOLDOVA, MD	
(72) Inventatori: RACOVIȚĂ Stela, MD; MOȘIN Veaceslav, MD; CAPCELEA Svetlana, MD; BOICIUC Chiril, MD; SPRINCEAN Mariana, MD	
(73) Titular: UNIVERSITATEA DE STAT DE MEDICINĂ ȘI FARMACIE "NICOLAE TESTEMIȚANU" DIN REPUBLICA MOLDOVA, MD	
(74) Mandatar autorizat: COȘNEANU Elena	

(54) Metodă molecular-genetică pentru depistarea microdelețiilor cromozomului Y în infertilitatea masculină**(57) Rezumat:**

1
Invenția se referă la medicină, în special la genetica moleculară și poate fi utilizată pentru depistarea microdelețiilor cromozomului Y în infertilitatea masculină.

Esența invenției constă în aceea că se efectuează analiza ADN-ului genomic izolat cu utilizarea reacției de polimerizare în lanț, cu analiza secvențelor sY84 și sY86 (AZFa), sY127 și sY134 (AZFb), sY254 și sY255 (AZFc) și SRY și ZFX/ZFY, sDBY1 și sY620 (AZFa), sY153 și sY158 (AZFc), sY117 și

2
sY143 (AZFb), se efectuează amplificarea fragmentelor de ADN, după care ADN-ul se separă prin metoda electroforetică sub influența unui curent electric continuu în gel de poliacrilamidă de 8% într-un sistem-tampon continuu, apoi gelul se colorează cu o soluție de bromură de etidium cu concentrația de 0,5 μg/mL, timp de 5 min, se spală timp de 1 min, și se fotodocumentează fragmentele obținute.

Revendicări: 4

Figuri: 1

MD 1489 Y 2021.01.31

(54) Molecular genetic method for detecting Y chromosome microdeletions in male infertility

(57) Abstract:

1
The invention relates to medicine, in particular to molecular genetics and can be used for detecting Y chromosome microdeletions in male infertility.

Summary of the invention consists in that the analysis of isolated genomic DNA is performed using the chain polymerization reaction, with the analysis of sY84 and sY86 (AZFa), sY127 and sY134 (AZFb), sY254 and sY255 (AZFc) and SRY and ZFX/ZFY, sDBY1 and sY620 (AZFa), sY153 and sY158 (AZFc), sY117 and sY143 (AZFb) sequences,

2
amplification of DNA fragments is performed, after which the DNA is separated by electrophoretic method under the action of constant electric current in an 8% polyacrylamide gel in a continuous buffer system, then the gel is stained with a solution of ethidium bromide with a concentration of 0.5 µg/ml, for 5 min, washed for 1 min, and the resulting fragments are photodocumented.

Claims: 4

Fig.: 1

(54) Молекулярно-генетический метод выявления микроделений Y-хромосомы при мужском бесплодии

(57) Реферат:

1
Изобретение относится к медицине, в частности, к молекулярной генетике, и может быть использовано для выявления микроделений Y-хромосомы при мужском бесплодии.

Сущность изобретения состоит в том, что выполняют анализ выделенной геномной ДНК с помощью реакции цепной полимеризации, с анализом последовательностей sY84 и sY86 (AZFa), sY127 и sY134 (AZFb), sY254 и sY255 (AZFc) и SRY и ZFX/ZFY, sDBY1 и sY620 (AZFa), sY153 и sY158 (AZFc), sY117 и

2
sY143 (AZFb), выполняют амплификацию фрагментов ДНК, после чего ДНК разделяют электрофоретическим методом под действием постоянного электрического тока в 8%-ом полиакриламидном геле в непрерывной буферной системе, затем гель окрашивают раствором бромистого этидия с концентрацией 0,5 мкг/мл, в течение 5 мин, промывают в течение 1 мин, и фотодокументируют полученные фрагменты.

П. формулы: 4

Фиг.: 1

Descriere:**(Descrierea se publică în varianta redactată de solicitant)**

- 5 Invenția se referă la medicină, în special la genetica moleculară și poate fi utilizată pentru depistarea microdelețiilor cromozomului Y în infertilitatea masculină.
- Organizația Mondială a Sănătății (OMS) a declarat infertilitatea o problemă globală de sănătate, datorită prevalenței înalte la nivel mondial și în special datorită anvergurii consecințelor negative asupra calității vieții (WHO. Infertility is a global public health issue. <http://www.who.int/reproductivehealth/topics/infertility/perspective/en/> (accessed 03, 2020); Datta J., Palmer M.J., Tanton C., Gibson L.J., Jones K.G., Macdowall W., et al. Prevalence of infertility and help seeking among 15 000 women and men. *Hum Reprod.*, 2016, no 31(9); Inhorn M.C., Patrizio P. Infertility around the globe: new thinking on gender, reproductive technologies and global movements in the 21st century., 2015, no 21(4), p. 411–426).
- 10
- 15 Tulburările de reproducere umane (TR) se caracterizează prin incapacitatea unui individ/cuplu de a concepe natural (sterilitate primară) ori prin incapacitatea de a menține o sarcină sau de a da naștere unui copil viu, sănătos (infertilitate) (World Health Organization. WHO Manual for the standardized investigation and diagnosis of the infertile couple. Cambridge, UK: Cambridge University Press., 1993).
- 20 Conform Comitetului Internațional pentru Monitorizarea Tehnologiei de Reproducere Asistată și Organizației Mondiale a Sănătății (OMS), infertilitatea este o boală a sistemului reproducător definită prin incapacitatea (unui cuplu) de a concepe după o perioadă de 1 an de raporturi sexuale regulate și neprotejate (definiție recomandată atât pentru practica clinică, cât și pentru cercetare) (Larsen U. Research on infertility: which definition should we use? *Fertility and Sterility* 2005; Zegers-Hochschild F., Adamson G.D., de Mouzon J., Ishihara O., Mansour R., Nygren K., et al. International Committee for Monitoring Assisted Reproductive Technology (ICMART) and the World Health Organization (WHO) revised glossary of ART terminology, 2009. *Fertil Steril.*, 2009, no 92, p. 1520-1524; Datta J., Palmer M.J., Tanton C., Gibson L.J., Jones K.G., Macdowall W., et al. Prevalence of infertility and help seeking among 15 000 women and men. *Hum Reprod.*, 2016, no 31(9)).
- 25
- 30 Cercetările epidemiologice, la nivel mondial estimează că aproximativ 15% dintre cuplurile de vârstă reproductivă se confruntă cu probleme legate de sterilitate și infertilitate (Azimi C, Khaleghian M., Farzanfar F. A retrospective chromosome studies among Iranian infertile women: Report of 21 years. *Iran J. Reprod. Med.*, 2013, no 11(4), p. 315-324). În fiecare an, sunt documentate 60...80 de milioane de cupluri ce suferă de infertilitate, afectând toate rasele și etniile, cu toate acestea majoritatea lor fiind rezidenți din țările în curs de dezvoltare și dezvoltate (Poongothai J., Gopenath T.S., Manonayaki S., Genetics of human male infertility *Singapore Med. J.*, 2009). Estimările statistice ale Organizației Mondiale a Sănătății demonstrează cruda realitate: unul din fiecare patru cupluri din țările dezvoltate nu poate obține o sarcină, în timp ce în Europa de Vest unul din fiecare șapte cupluri (Vander Borght M., Wyns C. Fertility and infertility: Definition and epidemiology. *Clin Biochem.*, 2018 (February), no 62, p. 2-10).
- 35
- 40 Infertilitatea este o problemă medicală, economică și socială, care reduce nivelul calității vieții, în special prin consecințele sale negative din punct de vedere psiho-social. Unele studii psiho-sociale realizate la cuplurile cu probleme de reproducere au dezvăluit că infertilitatea este o adevărată criză a vieții, ce se caracterizează prin experiențe stresante, inclusiv frustrări de autoînvinovățire și culpabilizare a partenerului, influențând semnificativ stabilitatea cuplului conjugal, care poate conduce la violență în familie și divorț (Current Practices and Controversies in Assisted Reproduction Report of a meeting on “Medical, Ethical and Social Aspects of Assisted Reproduction” held at WHO Headquarters in Geneva, Switzerland 17-21 September 2001). Mai mult, infertilitatea poate transformă o problemă individualizată de sănătate într-o suferință socială, pentru că infertilitatea interacționează cu o rețea complexă de relații sociale, așteptări sociale și necesități economice, datorate de costurile înalte la tratament (Karina M. Shreffler, Arthur L. Greil, and Julia McQuillan, Responding to Infertility: Lessons From a Growing Body of Research and Suggested Guidelines for Practice, 2016, no 176(1), p. 139-148).
- 45
- 50
- 55 Infertilitatea prezintă o importantă problemă națională de reproducere, în contextul în care Republica Moldova se confruntă din ce în ce mai mult creșterea adresabilității cuplurilor infertile, scăderii natalității și a sporului natural negativ constatată an de an. Strategia Națională a Sănătății Reprodusei 2005-2010, în parteneriat cu Ministerul Sănătății al Republicii Moldova, Organizația Mondială a Sănătății (OMS) și Fondul Națiunilor Unite pentru Populație (UNFPA) a stabilit pentru 10

ani domeniile prioritare în care eforturile maxime fiind concentrate pe prevenirea și managementul infertilității. Sănătatea Reproducerii fiind o prioritate necesară pe termen lung cu scop de a asigura exercitarea drepturilor reproductive ale tuturor cetățenilor Republicii Moldova. Tot în acest raport se evidențiază problemele cu care se confruntă Sistemul de Sănătate în domeniul Reproducerii, una din ele fiind și necesitatea studiilor de cercetare pentru evaluarea fenomenului infertilității la nivelul populației (Koo B., Stratila M., Ciubotaru V.. Strategiei Naționale a Sănătății Reproducerii 2005-2015).

Cauzele infertilității pot fi împărțite în patru mari categorii: 1) factorul feminin; 2) factorul masculin; 3) de cuplu, care sunt datorate cumulativ atât infertilității feminine cât și masculine; 4) infertilitate idiopatică, inexplicabilă. Este greu de atribuit procentajul exact pentru fiecare dintre aceste categorii; cu toate acestea, este raportat în general, că circa 40% din cazuri, infertilitatea se datorează unei cauze feminine, în proporție de 40% de cauze sunt masculine, iar în 20% la anomaliile detectate de ambii parteneri (Gianni Forti and Csilla Krausz, Andrology Unit, Department of Clinical Physiopathology, University of Florence, 50139 Florence, Italy Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism Printed in U.S.A. Copyright © 1998 by The Endocrine Society).

Infertilitatea masculină este o problemă medicală complexă în continuă creștere din mai multe motive. Unul din aceste motive este frecvența foarte înaltă, deoarece din toate cuplurile din întreaga lume ce nu reușesc să conceapă, factorul masculin fiind implicat în aproximativ 50% din cazuri. Unele studii epidemiologice la nivel global, argumentează, că factorul masculin contribuie la infertilitatea cuplului în mai mult de jumătate de cazuri în unele regiuni din țările dezvoltate. Creșterea incidenței infertilității masculine în țările dezvoltate fiind datorată și creșterii numărului de cupluri, care solicită tratamente pentru infertilitate (Inhorn M.C., Patrizio P. Infertility around the globe: new thinking on gender, reproductive technologies and global movements in the 21st century, 2015, no 21(4), p. 411-426; Agarwal A., Mulgund A., Hamada A., Chyatte M.R. A unique view on male infertility around the globe. *Reprod. Biol. Endocrinol.*, 2015, no 13(1)).

Fondul infertilității masculine fiind extrem de eterogen, cel mai frecvent fiind cauzată de tulburările de spermatogeneză, clinic manifestată prin azoospermie și oligospermie severă. Factorii genetici, explică aproximativ 30% dintre cazurile de infertilitate masculină asociate cu azoospermie și oligozoospermie severă (Hamada A.J., Esteves S.C., Agarwal A. A comprehensive review of genetics and genetic testing in azoospermia. *Clinics*, 2013, no 68 (S1), p. 39-60. Received for publication on September 5, 2012; Accepted for publication on September 6, 2012). Frecvența înaltă fiind justificată prin implicarea numeroaselor gene în controlul sexualizării și reproducerii. Dintre multiplele cauze genetice implicate în insuficiența spermatogenică, unele din cele mai relevante clinic, sunt anomaliile cromozomiale, microdelețiile cromozomului Y și mutațiile genei CFTR (gena receptorului canalului de Clor) (Joo Yeon Lee, Rima Dada, Edmund Sabanegh, Angelo Carpi, and Ashok Agarwal. Role of Genetics in Azoospermia *UROLOGY*, 2011, no 77 (3), p. 598-601).

Importanța diagnosticării genetice, la bărbații cu azoospermie, a crescut semnificativ datorită progreselor în tehnicile de reproducere asistată, cum ar fi injecția intracitoplasmatică de spermă (ICSI) și extragerii microchirurgicale de spermă (microTESE), ce ajută cuplurile infertile să nască copii biologici proprii.

Aceste evoluții au ridicat problema consecințelor genetice ale ICSI: preocupările legate de potențialul negativ al procedurii invazive și preocupările legate de riscul genetic. Consecințele acestui fapt nu sunt de loc de neglijat, pentru ca există riscuri asociate: pierderi de sarcină, copii cu anomalii genetice, descendenți cu probleme de infertilitate (Joo Yeon Lee, Rima Dada, Edmund Sabanegh, Angelo Carpi, and Ashok Agarwal. Role of Genetics in Azoospermia *UROLOGY*, 2011, no 77 (3), p. 598-601; Institute for Human Genetics, Division of Medical Genetics, Tübingen (Germany) Somatic chromosomal abnormalities in infertile men and women *Cytogenet Genome Res.*, 2005, no 111(3-4), p. 317-36).

Examenul citogenetic, molecular genetic permite explorarea cauzei infertilității masculine (Vander Borgh M., Wyns C. Fertility and infertility: Definition and epidemiology. *Clin. Biochem.*, 2018 (February), no 62, p. 2-10). Detectarea unui cariotip anormal și a diferitor mutații ar trebui să conducă la o consiliere genetică cuprinzătoare, care să includă toate informațiile despre tipul individual de anomalie/polimorfism cromozomial, relevanța sa clinică, posibila moștenire, riscul genetic al descendenților și posibilitățile de diagnostic prenatal (Institute for Human Genetics, Division of Medical Genetics, Tübingen (Germany) Somatic chromosomal abnormalities in infertile men and women *Cytogenet Genome Res.*, 2005, no 111(3-4), p. 317-336). Acest lucru permite cuplurilor infertile să ia o decizie în cunoștință de cauză, atunci când aleg pentru o reproducere asistată medical. Prin urmare, screening-ul citogenetic și molecular genetic continuă să ramână o bună practică pentru o diagnosticare adecvată, tratament, evaluare și prognostic (Gianni Forti and Csilla

Krausz, Andrology Unit, Department of Clinical Physiopathology, University of Florence, 50139 Florence, Italy Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism Printed in U.S.A. Copyright © 1998 by The Endocrine Society; Institute for Human Genetics, Division of Medical Genetics, Tubingen (Germany) Somatic chromosomal abnormalities in infertile men and women Cytogenet Genome Res., 2005, no 111(3-4), p. 317-336.

Infertilitatea este o tulburare extrem de complexă a sistemului reproductiv, eterogenă, care afectează atât bărbații cât și femeile, sau ambii parteneri. Cu toate acestea, în circa 25...30% dintre cupluri, nu este identificată nicio cauză, iar infertilitatea este considerată idiopatică (G.R. Dohlea, *, G.M. Colpib, T.B. Hargreavec, G.K. Pappd, A. Jungwirthe, W. Weidnerf .EAU Guidelines on Male Infertility, European Urology, no 48, 2005, p. 703–711; Mallepaly R., Butler P.R., Herati A.S., Lamb D.J. Genetic Basis of Male and Female Infertility. Monogr Hum Genet., 2017, no 21, p. 1-16). Evaluarea potențialului de fertilitate al partenerului masculin reprezintă o parte importantă în evaluarea unui cuplu, care nu a reușit să atingă sarcina. Această evaluare trebuie realizată simultan cu evaluarea partenerului feminin, dar nu este efectuată în cel puțin 18% din cazuri (Jungwirth A., Diemer T., Kopa Z., Krausz C., Tournaye H. European Association of Urology (EAU) guidelines on male infertility. Arnhem, The Netherlands: European Association of Urology, 2015).

S-a estimat la nivel mondial că circa 7% dintre toți bărbații, la vârsta reproductivă, sunt infertili, acest număr variază cu 2,5...15% în diferite regiuni geografice (Agarwal A., Mulgund A., Hamada A., Chyatte M.R. A unique view on male infertility around the globe. Reprod Biol Endocrinol., no 13(1), 2015; Jungwirth A., Diemer T., Kopa Z., Krausz C., Tournaye H. European Association of Urology (EAU) guidelines on male infertility. Arnhem, The Netherlands: European Association of Urology, 2015). În Europa Centrală și de Est numărul bărbaților infertili fiind de la 8 până la 12%, în Australia de 8% până la 9%, Europa de 7,5%, Africa 2,5...4,8% și America de Nord demonstrează rate de sex masculin infertili de 4,5...6,0% (Agarwal A., Mulgund A., Hamada A., Chyatte M.R. A unique view on male infertility around the globe. Reprod. Biol. Endocrinol., 2015, no 13(1); Collins H.P., Kalisch D. The health of Australia's males. Health. Canberra: Australian Institute of Health and Welfare, 2011). Global procentul cuplurilor infertile este citat în multiple surse de specialitate de 15%, iar în aproximativ jumătate din cazuri sunt datorate factorului masculin. Acest procent, de asemenea variază în diferite regiuni cu o prevalență mai mare în țările dezvoltate. Astfel, în Orientul Mijlociu factorul masculin fiind implicat în 60...70% din cazuri de infertilitate, în Europa Centrală și Est în 55,73%, în America Latină în 52%, în Europa și America de Nord în 50% și în Asia și Africa în jur de 40%. Creșterea incidenței infertilității masculine în țările dezvoltate fiind datorată și creșterii numărului de cupluri care solicită pentru tratamente de infertilitate, cum ar fi injecția intracitoplasmatică de spermă (ICSI) și Fertilizarea *in vitro* (FIV) (Inhorn M.C., Patrizio P. Infertility around the globe: new thinking on gender, reproductive technologies and global movements in the 21st century, 2015, no 21(4), p. 411–426; Agarwal A., Mulgund A., Hamada A., Chyatte M.R. A unique view on male infertility around the globe. Reprod. Biol. Endocrinol., 2015, no 13(1)).

Infertilitatea masculină se referă la incapacitatea unui bărbat de a rezulta sarcina în cuplu la o femeie fertilă. Conform Organizației Mondiale a Sănătății (OMS) infertilitatea datorată „factorului masculin” este explicată, ca o modificare a concentrației de spermă și/sau a motilității și/sau morfologiei, în cel puțin un eșantion de două analize de spermă, colectate la un interval între ele de unul și patru săptămâni. Astfel, bărbații care prezintă parametrii spermogramei sub valorile normale stabilite de OMS sunt considerați cu probleme de infertilitate cu implicarea factorului masculin (World Health Organization. Department of Reproductive Health and Research. WHO Laboratory Manual for the Examination and Processing of Human Semen. 5th ed. Geneva: World Health Organization, 2010, p. 1-287; Plachot M. Outcome of conventional IVF and ICSI on sibling oocytes in mild male factor infertility. Hum. Reprod., 2002, no 17(2), p. 362-369; Kumar N., Singh A. Trends of male factor infertility, an important cause of infertility: A review of literature. J. Hum. Reprod. Sci., 2015, no 8(4), p. 191-196). Cele mai semnificative dintre acestea sunt concentrația scăzută a spermatozoizilor (oligospermie), motilitatea scăzută a spermatozoizilor (astenospermie) și morfologia anormală a spermatozoizilor (teratospermie). Volumul de spermă și alți markeri seminali ai funcției epididimale, prostatice și a veziculei seminale, sunt mai puțin asociați cu infertilitatea (Harris I.D., Fronczak C., Roth L., Meacham R.B. Fertility and the aging male. Rev. Urol., 2011, no 13, p. 184-190; Sharma A. Male Infertility; Evidences, Risk Factors, Causes, Diagnosis and Management in Human. Ann. Clin. Lab. Res., 2017, no 05(03), p. 1-10). Cea mai semnificativă cauză a infertilității este concentrația mică a spermei, 90% din problemele de infertilitate masculină sunt legate de numărul spermatozoizilor. S-a demonstrat o asociere pozitivă între parametrii anormali ai spermei și numărul spermatozoizilor (Sabra S.M., Al-Harbi M.S. An influential relationship of seminal fluid microbial infections and infertility, Taif Region, KSA. World J. Med. Sci., 2014, no 10, p. 32-37;

Sharma A. Male Infertility; Evidences, Risk Factors, Causes, Diagnosis and Management in Human. Ann. Clin. Lab. Res., 2017, no 05(03), p. 1-10).

Calitatea și cantitatea materialului seminal este utilizată ca factor indirect de aprecierea potențialului de fertilitate masculină. Conform surselor de specialitate, analiza materialului seminal rămâne cea mai utilă și fundamentală investigație cu o sensibilitate de 89,6%, fiind capabil să detecteze 9 din 10 bărbați cu o problemă autentică de infertilitate (Kumar N., Singh A. Trends of male factor infertility, an important cause of infertility: A review of literature. J. Hum. Reprod. Sci., 2015, no 8(4), p. 191-196). Evaluarea spermogramei nu oferă nici o informație despre potențialul funcțional al spermatozoizilor de a suferi procese ulterioare de maturare necesare pentru a obține fertilizarea (Vander Borcht M., Wyns C. Fertility and infertility: Definition and epidemiology. Clin Biochem., 2018 (February), no 62, p. 2-10; Kumar N., Singh A. Trends of male factor infertility, an important cause of infertility: A review of literature. J. Hum. Reprod. Sci., 2015, no 8(4), p. 191-196). Este un test simplu, care evaluează formarea și maturitatea spermei, precum și modul în care sperma interacționează în lichidul seminal. De asemenea oferă o perspectivă nu numai asupra producției de spermă (număr), dar și a calității spermei (motilitate, morfologie) (World Health Organization. Department of Reproductive Health and Research. WHO Laboratory Manual for the Examination and Processing of Human Semen. 5th ed. Geneva: World Health Organization; 2010, p. 1-287; Kumar N., Singh A. Trends of male factor infertility, an important cause of infertility: A review of literature. J. Hum. Reprod. Sci., 2015, no 8(4), p. 191-96; Sharma A. Male Infertility; Evidences, Risk Factors, Causes, Diagnosis and Management in Human. Ann. Clin. Lab. Res., 2017, no 05(03), p. 1-10). Astfel, pentru evaluarea potențialului de fertilitate masculină, analiza spermogramei poate să nu fie întotdeauna un instrument de diagnostic optim, dar rămâne în continuare instrumentul clinic de bază.

De-a lungul anilor, au fost publicate numeroase studii, în care analiza materialului seminal a servit un instrument cheie, pentru evaluarea tendinței în infertilitatea masculină (Lackner J., Schatzl G., Waldhor T., Resch K., Kratzik C., Marberger M. Constant decline in sperm concentration in infertile males in an urban population: Experience over 18 years. Fertil. Steril., 2005, no 84, p. 1657-1661; Marimuthu P., Kapilashrami M.C., Misro M.M., Singh G. Evaluation of trend in semen analysis for 11 years in subjects attending a fertility clinic in India. Asian. J. Androl., 2003, no 5, p. 221-225). Analiza datelor din literatură indică faptul, că calitatea și cantitatea materialului seminal este în continuă descreștere, ceea ce scoate în lumină un fenomen alarmant de scădere a fertilității masculine. Acest lucru a fost ilustrat de mai multe studii din multiple regiuni ale lumii, care vin să argumenteze, că sănătatea reproductivă a bărbaților e într-un declin rapid în ultimii ani, cu unele variații în unele regiuni geografice (Geoffroy-Siraudin C., Dieudonne Loundou A., Romain F., Achard V., Courbiere B., Perrard M.H., et al. Decline of semen quality among 10 932 males consulting for couple infertility over a 20-year period in Marseille, France. Asian. J. Androl., 2012, no 14(4), p. 584-590; Louis J.F., Thoma M.E., Sorensen D.N., Mclain A.C., King R.B., Sundaram R. et al. The prevalence of couple infertility in the United States from a male perspective: Evidence from a nationally representative sample. Andrology., 2013, no 1(5), p. 741-748). Cum ar fi, un studiu realizat în Finlanda în perioada anilor 1998...2006, a constatat o scădere în calitatea materialului seminal în populația generală (Jorgensen N., Andersen A.G., Eustache F., Irvine D.S., Suominen J., Petersen J.H. et al. Regional differences in semen quality in Europe. Hum. Reprod., 2001, no 16, p. 1012-1019). Un alt studiu realizat în Tunisia de Sud, pe o perioadă de 12 ani pe un eșantion de 2940 de bărbați, care în relațiile infertile a concluzionat, de asemenea declinul calității materialului seminal (Feki N.C., Abid N., Rebai A., Sellami A., Ayed B.B., Guermazi M., et al. Semen quality decline among men in infertile relationships: Experience over 12 years in the South of Tunisia. J. Androl., 2009, no 30, p. 541-547). Mai mult, un studiu efectuat în Franța în anii 1988...2007, în cadrul Laboratorului de Biologie al Reproducerii al Spitalului Universitar din Marsilia, care a inclus analiza materialului seminal a 10932 de parteneri bărbați ai cuplurilor infertile, care a concluzionat că întreaga populație a demonstrat tendințe în scădere ale concentrației de spermă (1,5% pe an), numărului total de spermatozoizi (1,6% pe an), motilității totale (0,4% pe an), motilității rapide (5,5% pe an) și morfologiei normale (2,2% pe an) (Geoffroy-Siraudin C., Loundou A.D., Romain F., Achard V., Courbiere B., et al. Decline of semen quality among 10 932 males consulting for couple infertility over a 20-year period in Marseille, France. Asian. J. Androl., 2012, no 14, p. 584-590).

Un studiu similar s-a realizat împreună cu echipa de cercetare în Republica Moldova, pentru evaluarea sănătății reproductive ale bărbaților. Studiul a prezentat evaluarea retrospectivă în perioada anilor 2012...2018, pe un eșantion de 4625 de bărbați din rândul populației infertile, care au făcut analize ale materialului seminal în cadrul Laboratorului de Biologie al Reproducerii a Centrului Medical Repromed. Acest studiu indică faptul, că cantitatea și calitatea anormală a materialului seminal este implicată în aproximativ 59,8% la partenerii de sex masculin din cuplurile cu probleme

de infertilitate. Conform datelor noastre, acest procent crește cu 16,3%, de la 50% în anul 2012, la 66,3% în anul 2018. Rezultatele obținute, sunt similare cu alte studii de specialitate și ne relevă că cantitatea și calitatea materialului seminal, în populația bărbaților din Republica Moldova, care se confruntă cu infertilitatea în cuplu, a scăzut semnificativ. Motivul variațiilor geografice în caracteristicile materialului seminal nu sunt pe deplin elucidate, după cum sugerează mulți autori, credem, de asemenea că factorii de mediu și stilul de viață au efecte dăunătoare asupra spermatogenezei. De asemenea nu putem exclude contribuția factorilor genetici, care controlează nemijlocit calitatea și cantitatea spermatozoizilor (Ying Li, Hui Lin, Yafei Li and Jia Cao. Association between socio-psycho-behavioral factors and male semen quality: systematic review and meta-analyses. January 2011, vol 95, Issue 1, p. 116; G.R. Dohlea, *, G.M. Colpib, T.B. Hargreavec, G.K. Pappd, A. Jungwirthe, W. Weidnerf EAU Guidelines on Male Infertility, European Urology, 2005, vol 48, p. 703–711).

Termenul de "infertilitate masculină" nu constituie un sindrom clinic definit, ci mai degrabă, o colecție de condiții heterogene. Cel mai frecvent în proporție de 75%, fiind cauzată de tulburările de spermatogeneză, clinic manifestată prin astenozoospermie, teratozoospermie, oligospermie și azoospermie (Poongothai J., Gopenath T. S., Manonayaki S., Genetics of human male infertility, Singapore Med. J., 2009, no 50(4), p. 336). Etiologia producerii și funcției de spermă afectată poate fi legată de diferiți factori congenitali sau dobândiți, care acționează la nivel pre-testicular, post-testicular sau direct la nivel testicular. În ciuda multor tehnici avansate, care au îmbunătățit abilitățile de diagnostic, etiopatogeneza eșecului testicular rămâne necunoscută în proporție de 50% din cazuri și este denumită „infertilitate idiopatică” (Lotti F., Maggi M. Ultrasound of the male genital tract in relation to male reproductive health. Hum. Reprod. Update., 2015, no 21(1), p. 56-83). Prevalența cauzelor la nivel pre-testicular afectează bărbații în proporție de 5...10%. Această categorie de infertilitate include în principal două tipuri de afecțiuni patologice: hipogonadismul hipogonadotrop (HH) și tulburări de copulație (disfuncție erectilă, tulburări de ejaculare). În proporție de 10...20% sunt dedectate anomalii la nivel testicular, cele mai frecvente patologii la acest nivel sunt toate leziunile obstructive/nonobstructive ale tractului seminal, infecții și boli inflamatorii ale glandelor accesorii și infertilitate autoimună. Un număr mare de patologii pot conduce la o insuficiență testiculară ce prevalează la bărbați în proporție de 65...75%. Printre patologiiile din această categorie sunt următoarele afecțiuni: congenitale - criptorhidism (în special forme bilaterale), anorhidie bilaterală; afecțiuni de natură vasculară - torsiune testiculară de cordon, varicocel, forme iatrogene (medicamente gonadotoxice, chimio/radioterapie, chirurgie inghinală anterioară); unele boli provocate de factorii infecțioși, cum este epididimita, orhita, hidrocelul (Krausz C. Male infertility: pathogenesis and clinical diagnosis. Best Pract. Res. Clin. Endocrinol. Metab., 2011, no 25, p. 271-285; Beretta G. Clinical management of male infertility. Clin. Manag. Male Infertil. 2015, p. 1-187).

Factorii genetici pot fi identificați în fiecare dintre cele trei categorii de la nivel pre-testicular, testicular și post-testicular, aceasta se explică prin implicarea numărului impunător de gene în proporție de circa 2000, care se expresează în țesutul testicular, ce controlează diferențierea organelor sexuale, homeostazia hormonală, spermatogeneza (Krausz C. Male infertility: pathogenesis and clinical diagnosis. Best Pract. Res. Clin. Endocrinol. Metab., 2011, no 25, p. 271-285). Spermatogeneza acoperă o rețea complexă a proceselor, care apar în tubii seminiferi ai testiculelor. Procesele ulterioare ale spermatogenezei pot fi descrise ca: (I) proliferarea spermatogoniei; (II) diferențierea spermatogonială în spermatoците; (III) diviziunea meiotică a spermatoidelor rotunde; și (IV) eliberarea de spermatozoizi maturi extreme de specializați în lumenul tubului testicular (Bracke A., Peeters K., Punjabi U., Hoogewijs D., Dewilde S. A search for molecular mechanisms underlying male idiopathic infertility. Reprod. Biomed. Online, 2018, no 36(3), p. 327-339, Available from: <https://doi.org/10.1016/j.rbmo.2017.12.005>). Datorită etapelor complexe ale spermatogenezei și numărului impunător de gene implicate în spermatogeneză și doar o mică proporție din ele sunt identificate și analizate la bărbații infertili, etiologia infertilității idiopatice, cel mai probabil are o origine genetică (Krausz C., Giachini C. Genetic risk factors in male infertility. Arch Androl., 2007, no 53(3), p. 125–133). Conform saitului Online de Moștenire Mendeliană la Om (OMIM), se raportează peste 200 de afecțiuni genetice asociate cu infertilitatea masculină, de la cele mai frecvente prezentări clinice ale infertilității până la cele mai rare și complexe sindroame, în care semnele și simptomele sunt dincolo de problemele de reproducere. Potrivit unui studiu efectuat în anul 2002 de către o echipă de cercetători din Olanda, care au evaluat riscul genetic în diverse patologii implicate în infertilitatea masculină pe un eșantion de 150 de bărbați cu spermogramă afectată sever. Au relatat, ca la 23 bărbații cu criptorhidism, 5 (21,7%) dintre ei au prezentat o cauză genetică, din 15 bărbați cu varicocel, 3 (20,0%) din ei la fel au raportat o cauză genetică, din 6 bărbați cu absență congenitală bilaterală a canalului deferent (CBAVD), la 4 (66,6%) s-a identificat o cauză genetică și la 85 de

bărbați cu cauză inexplicabilă, 27 (31,7%) au prezentat o cauză genetică (Dohle G.R. Genetic risk factors in infertile men with severe oligozoospermia and azoospermia. Hum. Reprod., 2002, no 17(1), p. 13-16).

Se presupune că în aceste anomalii idiopatice ale spermatozoidelor sunt cauzate, de asemenea, de mai mulți factori, inclusiv stresului oxidativ, anomalii genetice necunoscute și epigenetice, perturbări endocrine prin poluarea mediului (Dohle G.R. Genetic risk factors in infertile men with severe oligozoospermia and azoospermia. Hum. Reprod., 2002, no 17(1), p. 13-16). De asemenea motilitatea spermei depinde de structurile ADN-ului sale, specifice ale spermatozoidelor, cum ar fi microtubulii, fibre dense exterioare și mitocondrii, care conferă energie pentru mișcările spermatozoidelor (Koo B., Stratila M., Ciubotaru V. Strategiei Naționale a Sănătății Reprodusei 2005-2015). Majoritatea proceselor de deteriorare a ADN-ului, ce au loc în tranzitul de la testicule la ejaculare, sunt cauzate de stresul oxidativ, care provoacă ruperea ADN-ului monocatenar. Stresul oxidativ face parte din categoria factorilor socio-psiho-comportamentali, cum ar fi dieta deficitară, utilizarea tehnologiilor timp îndelungat. De asemenea, include stresul psihologic, fumatul și consumul de alcool, care sunt factori de risc modificabili ale numărului de spermatozoizi mobili, ceea ce atrage o atenție deosebită, și ar trebui luat în considerare în procesul de culegere a istoricului medical, dar pentru care, în prezent, dovada științifică nu este pe deplin argumentată (Ying Li, Hui Lin, Yafei Li and Jia Cao. Association between socio-psycho-behavioral factors and male semen quality: systematic review and meta-analyses. January 2011, vol 95, Issue 1, p. 116). În unele cazuri, un stil de viață sănătos, tratamentul etiologic corect poate îmbunătăți fertilitatea bărbaților. Cu toate acestea, în cazul în care nu se reușește, cuplurile pot recurge la tehnologii de reproducere asistată (ART), cum ar fi FIV cu ICSI, pentru a obține sarcina.

Lipsa totală a spermatozoidelor din lichidul seminal recoltat sau ejaculat este denumită azoospermie, fiind și cea mai severă formă de infertilitate masculină. Azoospermia este identificată la 1 % în populația masculină, în timp ce frecvența azoospermiei în populația bărbaților infertili variază de la 10 până la 15% (Lee J.Y., Dada R., Sabanegh E., Carpi A., Agarwal A. Role of genetics in azoospermia. Urology, 2011, no 77(3), p. 598-601. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.urology.2010.10.001>; Of DD, Patient THEA. Report on evaluation of the azoospermic male. Fertil Steril., 2004, no 82 (SUPPL. 1); Committee P., Society A. Evaluation of the azoospermic male. Fertil Steril., 2008, no 90(5S), p. 74-77. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.fertnstert.2008.08.092>; Of DD, Patient THEA. Report on evaluation of the azoospermic male. Fertil Steril., 2004, no 82 (SUPPL. 1); Wosnitzer M., Goldstein M., Hardy M.P. Review of Azoospermia. Spermatogenesis., 2014, no 4(1), e28218; Hamada A.J., Esteves S.C., Agarwal A. A comprehensive review of genetics and genetic testing in azoospermia. Clinics, 2013, no 68(SUPPL. 1), p. 39-60). În Republica Moldova frecvența bărbaților cu azoospermie în rândul populației infertile, în perioada anilor 2012...2018 este de 4,3%. În trecut, bărbații cu azoospermie au fost clasificați cu infertilitate ireversibilă, iar utilizarea unui donator de spermatozoizi a fost considerată una dintre cele mai bune opțiuni de concepere. În prezent, datorită tehnicilor avansate de reproducere asistată, cum este ICSI și TESE, bărbații cu azoospermie chiar și cu cea mai severă formă de infertilitate, pot avea proprii copii biologici.

Diagnosticul inițial al azoospermiei este confirmat atunci când nu se pot detecta spermatozoizi în lichidul seminal centrifugat la examenul microscopic de rezoluție mare, în cel puțin de două ori consecutive, la un interval de minim de 2 săptămâni. Conform manualului de laborator pentru examinarea și prelucrarea materialului seminal uman al OMS din 2010, recomandă centrifugarea lichidului seminal, timp de 15 min la o viteză de centrifugare de preferință de 3000 rot./min sau mai mare (World Health Organization. Department of Reproductive Health and Research. WHO Laboratory Manual for the Examination and Processing of Human Semen. 5th ed. Geneva: World Health Organization, 2010, no (1), 287 p.). Pentru elucidarea cauzei azoospermiei se va recurge ulterior la o examinare medicală inițială, ce va include istoricul medical și sexual detaliat, evaluarea profilului hormonal, examinarea fizică a organelor genitale externe. Istoricul relevant include: 1) fertilitatea anterioară; 2) boli din copilărie, cum ar fi orhita virală sau criptorhidie; 3) traumatisme genitale sau intervenții chirurgicale anterioare în regiunea pelvină sau inghinală; 4) infecții precum epididimita sau uretrita; 5) expunerii la gonadotoxine, cum ar fi radioterapia anterioară/chimioterapia, febra recentă sau expunerea la căldură și medicamente curente; și 6) istoricul familial de anomalii congenitale la naștere, retard mental, tulburări de reproducere sau fibroză chistică. Examenul fizic trebuie să observe: 1) dimensiunea și consistența testiculelor; 2) caracteristicile sexuale secundare, inclusiv habitusul corporal, distribuția părului pe întreg corp, prezența ginecomastiei; 3) prezența congenitală bilaterală a canalului deferent; 4) consistența epididimidelor; 5) prezența unui varicocel; și 6) examinarea clinică a prostatei. Evaluarea hormonală inițială ar trebui să includă măsurarea nivelului

de testosteron seric și hormonului foliculostimulant (FSH) (Committee P., Society A. Evaluation of the azoospermic male. *Fertil Steril.*, 2008, no 90(5S), p. 74-77. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.fertnstert.2008.08.092>). În 70% din bărbați examinați, această evaluare preliminară identifică cauza, în restul de 30% dintre bărbați necesită testări suplimentare, cum ar fi testarea genetică pentru a elucida cauza de bază (Lee J.Y., Dada R., Sabaneh E., Carpi A., Agarwal A. Role of genetics in azoospermia. *Urology*, 2011, no 77(3), p. 598-601. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.urology.2010.10.001>). Evaluarea cauzei bărbaților cu azoospermia are ca scop: 1) să stabilească dacă cauza azoospermiei este susceptibilă terapiei; 2) să identifice eventualele opțiuni de tratament adecvat; și 3) să stabilească dacă este o tulburare medicală semnificativă ce cauzează azoospermia (Of DD, Patient THEA. Report on evaluation of the azoospermic male. *Fertil Steril.*, 2004, no 82 (Suppl. 1)).

Deși există numeroase cauze ale azoospermiei, etiologia acestei afecțiuni se încadrează în două categorii generale: azoospermia obstructivă și azoospermia non-obstructivă. Azoospermia obstructivă, care cuprinde 40% din cazurile de azoospermie, se referă la cauzele post-testiculare, care este însoțită de obicei de conservarea funcției exocrine și endocrine normale, cu spermatogeneza normală în testicule. Azoospermia obstructivă este produsă de obstrucții ale epididimului sau ale canalelor deferente, care împiedică spermatozoizii să ajungă la orice locație a tractului reproducător masculin. Azoospermia non-obstructivă reprezintă 60% din cazurile de azoospermie, este clasificată în două mari categorii pre-testiculare și testiculare. Cauzele pre-testiculare ale azoospermiei sunt relativ rare, și includ anomalii endocrine care afectează negativ spermatogeneza (insuficiență testiculară secundară). Sunt datorate în mare parte de hipogonadismul hipogonadotrop congenital, cu scăderea nivelurilor hormonului LH și FSH și cu dimensiuni mici ale testiculelor. Cauzele testiculare ale azoospermiei (insuficiență testiculară primară), implică tulburări intrinseci ale spermatogenezei în interiorul testiculelor (Of DD, Patient THEA. Report on evaluation of the azoospermic male. *Fertil Steril.*, 2004, no. 82 (Suppl. 1)). Azoospermia non-obstructivă rezultată de insuficiența testiculară primară, se caracterizează prin valori crescute ale hormonului LH, și FSH, testicule mici în dimensiuni, ce afectează până la 10% dintre bărbații, care prezintă infertilitate. Fiecare etiologie a azoospermiei este asociată cu un prognostic diferit, de la restabilirea producției de spermatozoizi în tractul reproducător, până la prezența sau lipsa spermatozoizilor în țesutul testicular (Wosnitzer M., Goldstein M., Hardy M.P. Review of Azoospermia. *Spermatogenesis*, 2014, no 4(1), e28218). Anomaliile pre-testiculare și post-testiculare, care provoacă azoospermie sunt reversibile și pot facilita refacerea potențialului de fertilitate. În schimb, tulburările testiculare sunt în general ireversibile, iar ratele de succes ale intervențiilor asociate cu anomalii testiculare intrinseci sunt semnificativ mai mici. Eșecul testicular primar în combinație cu azoospermia, este cel mai bine gestionat prin recoltarea spermei testiculare pentru eventuala ICSI. Cu toate acestea, etiologia exactă ar trebui să fie determinată de câte ori este posibil, iar tratamentul poate îmbunătăți ratele de succes ale recuperării spermei (Of DD, Patient THEA. Report on evaluation of the azoospermic male. *Fertil Steril.*, 2004, no 82 (Suppl. 1)).

Azoospermia non-obstructivă prezintă o etiologie heterogenă dintr-o multitudine de factori, cum este căldura, radiațiile, medicamentele, varicocele, infecțiile și cancerul. Etiologiile genetice contribuie semnificativ la dezvoltarea acestei afecțiuni în 21...29% din cazuri (Hernandez Uribe L., Hernandez Marin I., Cervera-Aguilar R., Ayala A.R. Frequency and etiology of azoospermia in the study of infertile couples. *Ginecol. Obstet. Mex.*, 2001, no 69, p. 322-326). În timp ce 12...41% din cazurile de azoospermie sunt idiopatice, și cel mai probabil legate de factori genetici necunoscuți. Aceste defecte genetice pot duce la o absență totală de spermatogeneză numită și „Sindromul Celulelor Sertoli (SCO)” sau într-o oprire de maturizare a spermatozoizilor (Bracke A., Peeters K., Punjabi U., Hoogewijs D., Dewilde S. A search for molecular mechanisms underlying male idiopathic infertility. *Reprod Biomed Online [Internet]*, 2018, no 36(3), p. 327-339. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.rbmo.2017.12.005>; Hernandez Uribe L., Hernandez Marin I., Cervera-Aguilar R., Ayala A.R. Frequency and etiology of azoospermia in the study of infertile couples. *Ginecol. Obstet. Mex.*, 2001, no 69, p. 322-326).

Bărbații cu azoospermie prezintă cel mai mare risc de a fi purtători de anomalii genetice (25%), iar acest risc scade progresiv odată cu creșterea producției de spermă. În epoca tehnologiilor de reproducere asistată (ART), în care sunt eliminate barierele naturale pentru fertilizarea ovulelor, definirea defectului genetic care stă la baza infertilității are și mai multă relevanță decât înaintea acestor tehnologii. Diagnosticarea unei cauze genetice de infertilitate are o semnificație clinică evidentă, deoarece ar putea avea implicații asupra sănătății reproductive și a sănătății generale a pacientului și a copiilor săi (Krausz C., Riera-Escamilla A. Genetics of male infertility. *Nature Reviews Urology*, 2018, vol. 15).

Microdelețiile cromozomului Y

Există un interes special pentru genele brațului lung al cromozomului Y, deoarece acestea joacă un rol esențial în spermatogeneză și dezvoltarea testiculelor. Asocierea între delețiile brațului lung a cromozomului Y și azoospermia a fost inițial sugerată de Tiepolo și Zuffardi în anul 1976 (Micic M., Micic S., Diklic V. Chromosomal constitution of infertile male. *Clin. Genet.*, 1984, no 25, p. 33-36). Cele mai multe dintre aceste gene sunt situate în regiunea Yq11.21-23 cunoscută ca regiunea azoospermia factor (AZF). În prezent, au fost cartografiate trei domenii genetice în regiunea AZF (AZFa, AZFb, AZFc), în intervalul 5 și 6 pe brațul distal al cromozomului Y (fig. 1) (Hargreave T.B. Genetic basis of male fertility. *Br. Med. Bull.*, 2000, no 56(3), p. 650-671).

Delețiile sub-microscopice ale cromozomului Y nu sunt vizibile prin analiză citogenetică clasică, și sunt cea mai frecventă cauză molecular-genetică a infertilității masculine. Prevalența delețiilor cromozomului Y este estimată la aproximativ de la 1:2000 până la 1:3000 din bărbați (Vogt P.H., Fernandes S. Polymorphic DAZ gene family in poly-morphic structure of AZFc locus: artwork or functional for human spermatogenesis? *Acta Pathol. Microbiol. Immunol. Scand.*, 2003, no 111, p. 115-127). Microdelețiile genelor din aceste regiuni pot duce la diferite grade de eșec spermatogen, și prin urmare infertilitate, a căror prevalență crește odată cu severitatea ei. Microdelețiile în cadrul regiunii AZF sunt depistate la aproximativ 4% dintre bărbații cu oligozoospermie; 14% dintre bărbații cu oligozoospermie severă; iar 10...18% la bărbații cu azoospermie non-obstructivă (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, no 27, p. 240-249). Regiunea AZF este absentă la 1 din 8 bărbați azospermici cu constituția cariotipului normal (Stahl P.J., Masson P., Mielnik A., Marean M.B., Schlegel P.N., Paduch D.A. A decade of experience emphasizes that testing for Y microdeletions is essential in American men with azoospermia and severe oligozoospermia. *Fertil Steril.*, 2010, no 94, p. 1753-1756).

Frecvența microdelețiilor cromozomului Y sunt frecvent diagnosticate într-un procent variabil în infertilitatea masculină, în diferite populații geografice. La populația bărbaților din Mexic frecvența AZF deleții este de 12% din 50 cu azoospermie (Shinka T., Nakahori Y. The azoospermic factor on the Y chromosome. *Acta Paediatr. Jpn.*, 1996, no 38, p. 399-404). Conform unui studiu realizat în China la 945 bărbați cu azoospermie, frecvența microdelețiilor în regiunea AZF este identificată în 11,5% (Li D, Zhang H., Wang R., Zhu H., Li L., Liu R. Chromosomal abnormalities in men with pregestational and gestational infertility in northeast China. *J. Assist. Reprod. Genet.*, 2012, no 29, p. 829-836). Date similare de 11,7% sunt raportate de către Japonia pe un eșantion de 60 bărbați azospermici și 11,8% de către Tunisia pe un eșantion de 76 de bărbați cu azoospermie (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, no 48, p. 351-358; Rejeb I., M'Rad R., Maazoul F., Trabelsi M., Ben Jemaa L., Chaabouni M., Zhioua F., Chaabouni H. Y chromosome microdeletions in Tunisian infertile males. *Pathol. Biol. (Paris)*, 2008, no 56, p. 111-115). Conform unui studiu realizat în SUA, pe un grup de 385 bărbați cu azoospermie, incidența AZF deleții fiind 10,4% (Stahl P.J., Masson P., Mielnik A., Marean M.B., Schlegel P.N., Paduch D.A. A decade of experience emphasizes that testing for Y microdeletions is essential in American men with azoospermia and severe oligozoospermia. *Fertil. Steril.*, 2010, no 94, p. 1753-1756). În jur de 8,3% au fost raportate microdeleții în regiunea AZF de către Jordania, din 34 bărbați azospermici și Norvegia 8,1% din 37 bărbați cu azoospermie. În Africa de Sud frecvența microdelețiilor cromozomului Y la 50 de bărbați cu azoospermie și oligozoospermie severă a fost de 22% (Atia T., Abbas M., Ahmed A.F. Azoospermia factor microdeletion in infertile men with idiopathic severe oligozoospermia or non-obstructive azoospermia. *African J. Urol.* [Internet], 2015, no 21(4), p. 246-253. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.afju.2015.02.004>). De asemenea frecvențe joase sunt raportate de către Algeria de 2%, Slovacia de 4,6% (Behulova R., Varga I., Strhakova L., Bozikova A., Gabrikova D., Boronova I. et al. Incidence of microdeletions in the AZF region of the Y chromosome in Slovak patients with azoospermia. *Biomed. Pap.*, 2011, no 155(1), p.33-38, și Turcia - 1,3% la bărbații azospermici (Khabour O.F., Fararjeh A.F.S., Alfaouri A.A. Genetic screening for AZF Y chromosome microdeletions in Jordanian azoospermic infertile men. *Int. J. Mol. Epidemiol. Genet.*, 2014, no 5(1), p. 47-50). Eterogenitatea rezultatelor delețiilor în regiunea AZF în diferite regiuni geografice se poate datora metodei de diagnosticare - diferitelor numere de primeri STS folosiți în detectarea mutației, unei variații a criteriilor selective utilizate pentru pacienții infertili recrutați sau faptului că studiile au fost efectuate pe diferite populații etnice (Atia T., Abbas M., Ahmed A.F. Azoospermia factor microdeletion in infertile men with idiopathic severe oligozoospermia or non-obstructive azoospermia. *African J. Urol.* [Internet], 2015, no 21(4), p. 246-253. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.afju.2015.02.004>).

Marea majoritate a microdelecțiilor apar *de novo*, și au fost atribuite recombinării omologe intracromozomiale în ampliconi instabili grupați în cadrul acestei regiuni. Microdelecțiile elimină una sau mai multe gene implicate în spermatogeneză și ca rezultat cauzează defecte variate ale spermatogenezei. Genele candidate în regiunile AZF au fost studiate pe larg, fiind recunoscute că joacă roluri critice în reglarea ciclului meiozei ale celulelor germinale.

Cele mai frecvente microdelecții ale cromozomului Y se întâlnesc în regiunea AZFc cu o frecvență de aproximativ 60%. Frecvența mai înaltă a delețiilor în regiunea AZFc, se datorează în mare parte mărimii, care este mai mare comparativ cu regiunea AZFa și AZFb (Gary L. Harton and Helen G. Tempest, Chromosomal disorders and male infertility, Asian Journal of Andrology, 2012, no 14, p. 32-39).

Familia genei DAZ (Deleted in Azoospermia) este raportată ca fiind cea mai frecventă genă ce prezintă deleții în regiunea AZFc cu o frecvență de 13% la bărbații azoospermici, în concordanță bună cu rata microdelecțiilor de la 5% la 20% (Gary L. Harton and Helen G. Tempest, Chromosomal disorders and male infertility, Asian Journal of Andrology, 2012, no 14, p. 32-39; Atia T., Abbas M., Ahmed A.F. Azoospermia factor microdeletion in infertile men with idiopathic severe oligozoospermia or non-obstructive azoospermia. African J. Urol. [Internet], 2015, no 21(4), p. 246-253. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.afju.2015.02.004>; Vogt P.H., Fernandes S. Polymorphic DAZ gene family in poly-morphic structure of AZFc locus: artwork or functional for human spermatogenesis? Acta Pathol. Microbiol. Immunol. Scand., 2003, no 111, p. 115-127). Gena DAZ aparține unei familii de gene, care codifică proteinele ce se leagă la ARN (acid ribonucleic) fiind exprimate exclusiv în celulele germinale și controlează spermatogeneza. Delețiile locusului AZFc cauzează defecte ale spermatogenezei variind în severitate, de la azoospermie datorată celulelor Sertoli și până la oligozoospermie (J. A. Loginova, I. I. Nagornaya, S. A. Shlikova, L. I. Petrova, M. V. Ribakova, T. V. Kuznetsova and V. S. Baranov. Molecular Genetic Analysis of Y-Chromosome Microdeletions in Men with Severe Spermatogenetic Defects, Molecular Biology, 2003, vol. 37, no. 1, p. 67-73).

Tulburările severe ale spermatogenezei implică microdelecții la începutul brațului distal al cromozomului Yq11.21 din regiunea AZFa. Deleții *de novo* a genelor din regiunea Yq11.21 determină pierderea completă a celulelor germinale, caracteristic doar pentru sindromul celulelor sertoli (Sertoli cell-only syndrome) (SCOS), o afecțiune caracterizată prin prezența celulelor Sertoli în testicule și lipsa spermatozoizilor (Diemer T., Desjardins C. Developmental and genetic disorders in spermatogenesis. Hum. Reprod. Update, 1999, no 5(2), p. 120-140). Locusul AZFa este situat în partea proximală a brațului lung al cromozomului Y și cuprinde aproximativ 1,1 Mb (Selva D.M., Hammond G.L. Human sex hormone-binding globulin is expressed in testicular germ cells and not in Sertoli cells. Horm. Metab. Res., 2006, no 38, p. 230-235). Această regiune include 4 gene inclusiv USP9Y (Ubiquitinspecific protease 9, Y chromosome), DBY (dead box on the Y), UTY (ubiquitous TPR motif on the Y) și TB4Y (thymosin B4-isoform). În cazul deleției ambelor gene USP9Y și DBY cauzează SCOS, astfel această regiune fiind esențială pentru fertilitate. Gena USP9Y este prezentă într-o singură copie, care este exprimată într-o mare varietate de țesuturi și realizează funcții asemănător ubiquitin hidrolazei (Selva D.M., Hogeveen K.N., Seguchi K., Tekpetey F., Hammond G.L. A human sex hormone-binding globulin isoform accumulates in the acrosome during spermatogenesis. J. Biol. Chem., 2002, no 277, p. 45291-45298).

Deleții mici în gena USP9Y par a fi asociate cu spermatogeneza severă, cauzând azoospermie, oligozoospermie, sau oligoastenoazoospermie, pacienții cu deleții a genei DBY prezintă sindromul celulelor Sertoli, o afecțiune caracterizată prin prezența celulelor Sertoli în testicule și lipsa spermatozoizilor (Jungwirth A., Diemer T., Kopa Z., Krausz C., Tournaye H. European Association of Urology (EAU) guidelines on male infertility. Arnhem, The Netherlands: European Association of Urology, 2015).

Principala genă din regiunea AZFb fiind RBMY1, care codifică proteină de legare a ARN-ului specific/factor de imbinare (testis-specific RNA binding protein/splicing factor) fiind exprimată în nucleele spermatogoniilor, spermatocitelor. Familia genelor PRY, de asemenea se găsesc în regiunea AZFb, fiind implicate în apoptoză, un proces esențial pentru înlăturarea spermatozoizilor anormali (Jungwirth A., Diemer T., Kopa Z., Krausz C., Tournaye H. European Association of Urology (EAU) guidelines on male infertility. Arnhem, The Netherlands: European Association of Urology, 2015).

Bărbații purtători de microdelecții ale cromozomului Y nu prezintă simptome clinice, cu excepția afectării spermatogenezei, aparent sunt perfect sănătoși și duc o viață normală, însă cu prognostic nefavorabil pentru reproducere (T. Atiaa, M. Abbasa, A.-F. Ahmedc. Azoospermia factor microdeletion in infertile men with idiopathic severe oligozoospermia or non-obstructive

azoospermia. Received 6 October 2014; accepted 3 February 2015). Sunt cunoscute tulburările spermatogenezei datorate mutațiilor genice ale cromozomului Y (tab. 1)

Tulburări ale spermatogenezei datorate mutațiilor genice ale cromozomului Y

Tabelul 1

Locus	Gena	Anomalie	Fenotip	Manifestări gonadale	Manifestări extra-gonadale	Spermatogeneza
Yp11.3	SRY	XX-masculin	masculin	disginezie	inversiune	celule germinale
		XY-femenin	femenin	gonadică	de sex	absente
Yq11.21	necunoscută	azoospermia	masculin	tulburări de spermatogeneză	delipsă	celule germinale absente
AZF 'a'	USP9Y	factorul 'a'				
Yq11.22-23	DBY	azoospermia	masculin	tulburări de spermatogeneză	lipsă	doar celule Sertoli blocarea spermatogenezei
AZF 'b'	RBM1 TSPY EIF1AY DAZ	factorul 'b'				la nivel de spermatocit sau spermatidă spermatogeneză
Yq11.22-23		azoospermia	masculin		lipsă	
AZF 'c'	DAZ2 TTY1+2	factorul 'c'		tulburări de spermatogeneză		blocată sau blocarea spermatidelor în dezvoltare

5 (Diemer T., Desjardins C. Developmental and genetic disorders in spermatogenesis. Hum. Reprod. Update, 1999, vol. 5(2), p. 120-140).

10 Este cunoscută metoda molecular-genetică pentru depistarea microdelețiilor cromozomului Y, care constă în aceea că se analizează ADN-ul genomic izolat, conform procedurii standard, din sange periferic prin tehnica multiplex PCR (reacția de polimerizare în lanț). Secvențele țintă utilizate sunt sY84 și sY86 (AZFa), sY127 și sY134 (AZFb), sY254 și sY255 (AZFc) și SRY și ZFX/ZFY (pentru control). Amorsele specifice utilizate pentru amestecul multiplex și lungimile produselor PCR sunt prezentate în tab. 2. Se va analiza microdelețiile în 6 loci specifici pentru cromozomul Y, dintre care gena SRY va permite și diagnosticarea bărbaților XX – cu tulburare testiculară de dezvoltare sexuală (DSD).

15 Secvențele de primeri ale STSs (sequence-tagged-sites) utilizate în detectarea regiunilor AZF și genei SRY

Tabelul 2

STS	Regiunea crs.Y	Locus	Secvența primer
SY14	Yp	ZFY	F- ACCRCTGTA CTGACTGTGATTACAC R- GCACYTCTTTGGTATCYGAGAAAGT
SY14	Yp	SRY	F- GAATATCCCGCTCTCCGGA R- GCTGGTGCTCCATTCTTGAG
sY84	AZFa	DYS388	F- AGAAGGGTCTGAAAGCAGGT R- GCCTACTACCTGGAGGCTTC
sY86		DYS148	F- GTGACACACAGACTATGCTTC R- ACACACAGAGGGACAACCCT
sY127	AZFb	DYS218	F- GGCTCACAACGAAAAGAAA R- CTGCAGGCAGTAATAAGGGA
sY134		DYS224	F- GTCTGCCTCACCATAAAACG R- ACCACTGCCAAAACCTTCAA
sY254	AZFc	DAZ	F- GGGTGTACCAGAAGGCAAA R- GAACCGTATCTACCAAAGCAGC
sY255		DAZ	F- GTTACAGGATTCGGCGTGAT R- CTCGTCATGTGGCAGCCAC

Principiul reacției de polimerizare în lanț pentru detectarea microdelețiilor cromozomului Y sunt:

- pregătirea eprubetelor de tip Eppendorf necesare la realizarea analizei, se marchează în dependență de numărul de probe, care necesită să fie supuse analizei inclusiv și probele controlului pozitiv intern (feminin XX), control pozitiv extern (masculin-norma) și negativ (H₂O). Se prepara 2 seturi de eprubete cu același număr, dar care corespund la cele 2 seturi de primeri;
- pentru I set de primeri (ZFY, SRY, sY254, sY86, sY127), se prepară mixul de reacție (*per probă*) cu volumul total de 25,5 μL:
 - a. 10X 10XKCl și (NH₄)₂SO₄(Dream Taq Green buffer)(+20mM MgCl₂) = 2,5 μL,
 - b. dNTP (2mM) = 2,5 μL,
 - c. H₂O= 18 μL
 - d. primeri mix (5mM) = 0,5 μL/*per* pereche de primer ce conține primerii:
 ZFY: F- ACCRCTGTA**CT**GACTGTGATTACAC
 R- GCACYTCTTTGGTATCYGAGAAAGT
 - 15 SRY: F- GAATATTCCCGCTCTCCGGA
 R- GCTGGTGCTCCATTCTTGAG
 - sY254: F- GGGTGTTACCAGAAGGCAAA
 R- GAACCGTATCTACCAAAGCAGC
 - sY86: F- GTGACACACAGACTATGCTTC
 R- ACACACAGAGGGACAACCCCT
 - 20 sY127: F- GGCTCACAACGAAAAGAAA
 R- CTGCAGGCAGTAATAAGGGA
 - e. Dream Taq polymerase = 0,4 μL
 - f. ADN extras= 2 μL;
- pentru al II set de primeri (ZFY, SRY, sY255, sY84, sY134), preparăm mixul de reacție (*per probă*) cu volumul total de 25,5 μL:
 - g. 10X 10X KCl și (NH₄)₂SO₄(Dream Taq Green buffer)(+20mM MgCl₂) = 2,5 μL,
 - h. dNTP (2mM) = 2,5 μL,
 - i. H₂O= 18 μL
 - 30 j. primeri mix (5mM) = 0,5 μL/*per* pereche de primer ce conține primerii:
 ZFY: F- ACCRCTGTA**CT**GACTGTGATTACAC
 R- GCACYTCTTTGGTATCYGAGAAAGT
 - SRY: F- GAATATTCCCGCTCTCCGGA
 R- GCTGGTGCTCCATTCTTGAG
 - 35 sY255: F- GTTACAGGATTCCGGCGTGAT
 R- CTCGTCATGTGGCAGCCAC
 - sY84: F- AGAAGGGTCTGAAAGCAGGT
 R- GCCTACTACCTGGAGGCTTC
 - sY134: F- GTCTGCCTCACCATAAAACG
 R- ACCACTGCCAAAACCTTCAA
 - 40 k. Dream Taq polymerase = 0,4 μL
 - l. ADN extras= 2 μL;
- în eprubeta marcată cu „K1”, se adaugă 2 μL de ADN cu genotipul cunoscut- control pozitiv (XX), cu „K2”, se adaugă 2 μL de ADN cu genotipul cunoscut- control pozitiv masculin-norma, iar în eprubeta marcată cu „K-” nu se introduce nici un ADN;
- toate probele se introduc în termociclul “Biometra” și se introduce regimul de amplificare (tab. 3).

Programul de amplificare a termociclului “Biometra”

Tabelul 3

Ciclul	Temperatura, °C	Timpul	Numărul de repetări ale ciclurilor
1	95	3 min	1
2	94	30 sec	33
	59	45 sec	
	72	50 sec	
3	72	5 min	1
4	16	fără limită	1

Analiza prin electroforeză a ADN-ului amplificat.

Fragmentele amplificate de ADN sunt analizate prin metoda separării electroforetice sub influența unui curent electric continuu într-un sistem-tampon continuu. ADN-ul este separat în gel de poliacrilamidă de 8%. În calitate de sistem-tampon de migrare se utilizează TBE 1X cu pH=8,0.

5 Pentru prepararea soluției de TBE 10X se utilizează:

- 1) 21,6 g 2-Amino-2-(hidroximetil)-1,3-propanediol
- 2) 11,0 g borat
- 3) 8 mL EDTA (0,5 M)
- 4) H₂O până la 200 mL.

10 Pentru obținerea soluției de TBE 1X, soluția inițială se diluează de 10 ori.

Prima etapă în efectuarea electroforezei constă în asamblarea matriței, care este alcătuită din 2 plăci de sticlă și 2 spacere din material plastic.

Pentru prepararea gelului de poliacrilamidă de 8% se utilizează componentele:

- 1) Acrilamidă/bis-acrilamidă 30% - 10,6 mL
- 15 2) TBE 10X = 4 mL
- 3) PSA 10% = 400 μL
- 4) TEMED = 40 μL
- 5) H₂O până la 40 mL

20 Matricea cu gelul preparat se introduce în cuva aparatului de electroforeză cu electrozii de platină asamblați; rezervoarele superior și inferior se umplu cu soluție-tampon de migrare. Electrozii se conectează la sursa de curent continuu la 100 V -35 mA- 30 min, apoi 200 V-70mA- 4 ore. Preelectroforeza durează 15 min, după care se stopează sursa de curent și se sondează probele de ampliconi (7,5 μL) în gel împreună cu un marker de greutate de 50 perechi de baze. Se conectează sursa de curent din nou.

25 După migrare se deconectează cuva aparatului de electroforeză de la sursa de curent electric continuu, se detașează și se dezassemblează matricea, iar gelul obținut este supus operațiunilor de colorare cu soluție de bromura de etidium (C = 0,5 μg/mL), timp de 5 min. Gelul se spală cu apă, timp de 1 min și este fotodocumentat la aparatul UV SOLO. În urma vizualizării se obține următoarele fragmente, conform tab. 4.

30

Tabelul 4

Control (XX)	Control XY (norma) I set	Control XY (norma) II set	Control negativ
ZFY- 495 pb.	ZFY : 495 bp	ZFY : 495 bp	
	SRY : 472 bp	SRY : 472 bp	
	sY254 : 400 bp (AZFc)	sY84 : 326 bp (AZFa)	
	sY86 : 320 bp (AZFa)	sY134 : 301 bp (AZFb)	
	sY127 : 274 bp (AZFb)	sY255 : 126 bp (AZFc)	

[1].

Dezavantajele metodei cunoscute constau în aceea că sunt analizate microdelețiile cromozomului Y într-un număr mic de loci specifici, din care cauză nu sunt depistate unele microdeleții, ceea ce complică stabilirea diagnosticului de infertilitate masculină cu stabilirea unui tratament eficient.

35

Problema pe care o rezolvă invenția constă în elaborarea unei metode eficiente de depistare a microdelețiilor cromozomului Y, care permite de a mări sensibilitatea testului multiplex PCR și o abordare mai complexă, mult mai exactă în diagnosticul și tratamentul pacienților cu infertilitate masculină.

40

Esența invenției constă în aceea că se efectuează analiza ADN-ului genomic izolat cu utilizarea reacției de polimerizare în lanț, cu analiza secvențelor sY84 și sY86 (AZFa), sY127 și sY134 (AZFb), sY254 și sY255 (AZFc) și SRY și ZFX/ZFY, sDBY1 și sY620 (AZFa), sY153 și sY158 (AZFc), sY117 și sY143 (AZFb), se efectuează amplificarea fragmentelor de ADN, după care ADN-ul se separă prin metoda electroforetică sub influența unui curent electric continuu în gel de poliacrilamidă de 8% într-un sistem-tampon continuu, apoi gelul se colorează cu o soluție de bromură de etidium cu

45

concentrația de 0,5 μg/mL, timp de 5 min, se spală timp de 1 min, și se fotodocumentează fragmentele obținute.

Rezultatul invenției constă în mărirea sensibilității testului multiplex PCR, cât și testarea genelor cu diagnosticarea unui număr mai mare și mai exact de microdeleții ale cromozomului Y cu stabilirea unui tratament eficient la pacienții cu infertilitate masculină.

Avantajele metodei revendicate.

Datorită metodei revendicate pot fi analizate microdelețiile cromozomului Y în 12 loci specifici, comparativ cu metoda inițială unde se analizau doar 6. Secvențele țintă utilizate inițial sunt următoarele: sY84 și sY86 (AZFa), sY127 și sY134 (AZFb), sY254 și sY255 (AZFc) și SRY și ZFX/ZFY (pentru control). Secvențele țintă noi introduse sunt următoarele: sDBY1 și sY620 (AZFa), sY153 și sY158 (AZFc), sY117 și sY143 (AZFb). Prin urmare, introducerea noilor primeri vor permite atât mărirea sensibilității testului multiplex PCR, cât și testarea genelor, care nu au mai fost testate până la momentul actual în Republica Moldova. Genele testate în premieră în țara noastră, datorită amorsoarelor țintă noi introduse, sunt următoarele: sDBY1 - gena DBY și sY620 – gena USP9Y; sY153 - gena DYS237 și sY158 - gena DYS 241; sY117 - gena DYS209 și sY143 - gena RBM1. Testarea noilor gene va permite o abordare mai complexă, mult mai exactă în diagnosticul și tratamentul pacienților cu infertilitate masculină. Spre exemplu, în cazul delețiilor ambelor gene USP9Y (ubiquitinspecific protease 9, Y chromosome) și DBY (dead box on the Y), cauzează sindromul celulelor Sertoli, o afecțiune caracterizată prin prezența celulelor Sertoli în testicule și lipsa spermatozoizilor. În acest caz, nu se recomandă extragerea microchirurgicală de spermă prin (microTESE) și utilizarea injecției intracitoplasmatică de spermă (ICSI), spermatogeneza reziduală nu poate fi prezentă în testicule. În asemenea caz, cuplul poate să opteze pentru utilizarea spermei de la donator sau adopția unui copil.

Invenția este demonstrată în figură, care reprezintă rezultatele electroforezei pentru microdelețiile cromozomului Y: 1 – AND control feminin; 2,3 – bărbat normal; 4 – pacient cu deleții (a, b, c) ale cromozomului Y și prezența SRY și ZFY

Metoda se realizează în modul următor.

Pentru identificarea microdelețiilor cromozomului Y se va analiza ADN-ul genomic izolat conform procedurii standard din sângele periferic prin tehnica multiplex PCR (reacția de polimerizare în lanț). Secvențele țintă utilizate inițial sunt următoarele: sY84 și sY86 (AZFa), sY127 și sY134 (AZFb), sY254 și sY255 (AZFc) și SRY și ZFX/ZFY (pentru control). Secvențele țintă noi introduse sunt următoarele: sDBY1 și sY620 (AZFa), sY153 și sY158 (AZFc), sY117 și sY143 (AZFb).

Amorsele specifice utilizate pentru amestecul multiplex și lungimile produselor PCR sunt prezentate în tab. 5.

Secvențele de primeri ale STSs (sequence-tagged-sites) utilizate în detectarea regiunilor AZF

Tabelul 5

STS	Regiunea crs.Y	Locus	Secvența primer
SY14	Yp	ZFY	<i>F- ACCRCTGTA CTGACTGTGATTACAC</i> <i>R-GCACYTCTTTGGTATCYGAGAAAGT</i>
SY14	Yp	SRY	<i>F- GAATATTCCCGCTCTCCGGA</i> <i>R- GCTGGTGCTCCATTCTTGAG</i>
sY84	AZFa	DYS 388	<i>F- AGAAGGGTCTGAAAGCAGGT</i> <i>R- GCCTACTACCTGGAGGCTTC</i>
sY86		DYS148	<i>F- GTGACACACAGACTATGCTTC</i> <i>R- ACACACAGAGGGACAACCCT</i>
DBY1		DBY	<i>F- TATTGGCAATCGTGAAAGAC</i> <i>R-TGCCGGTGCCTCTACTGGT</i>
sY620		USP9Y	<i>F- GGCTGATATATTTAACC</i> <i>R- ACTCAAAAACAACACAGTC</i>
sY127		AZFb	DYS218

MD 1489 Y 2021.01.31

16

sY134		DYS224	<i>F- GTCTGCCTCACCATAAAACG</i> <i>R- ACCACTGCCAAAACITTTCAA</i>
sY117		DYS209	<i>F- GTTGGTTCATGCTCCATAC</i> <i>R- CAGGGAGAGAGCCTTTTACC</i>
sY143		RBM1	<i>F- GCAGGATGAGAAGCAGGTAG</i> <i>R- CCGTGTGCTGGAGACTAATC</i>
sY254	AZFc	DAZ	<i>F- GGGTGTACCAGAAGGCAAA</i> <i>R- GAACCGTATCTACCAAAGCAGC</i>
sY255		DAZ	<i>F- GTTACAGGATTCGGCGTGAT</i> <i>R- CTCGTCATGTGGCAGCCAC</i>
sY153		DYS237	<i>F- GCATCCTCATTTTATGTCCA</i> <i>R- CAACCCAAAAGCACTGAGTA</i>
sY158		DYS241	<i>F- CTCAGAAGTCCTCCTAATAGTTCC</i> <i>R- ACAGTGGTTTGTAGCGGGTA</i>

Principiul metodei reacției de polimerizare în lanț pentru detectarea microdelețiilor cromozomului Y:

- 5 - pregătirea eprubetelor de tip Eppendorf necesare pentru realizarea analizei, se marchează în dependență de numărul de probe, care necesită să fie supuse analizei, inclusiv și probele controlului pozitiv intern (feminin XX), control pozitiv extern (masculin-norma) și negativ (H₂O). Se prepara 2 seturi de eprubete cu același număr, dar care corespund celor 2 seturi de primeri;
- 10 - pentru I set de primeri (ZFY, SRY, sY254, sY86, sY127), se prepară mixul de reacție (*per probă*) cu volumul total de 25,5 μL:
- m. 10X 10XKCl și (NH₄)₂SO₄(Dream Taq Green buffer)(+20mM MgCl₂) = 2,5 μL,
n.dNTP (2mM) = 2,5 μL,
o.H₂O= 18 μL
- 15 p.primeri mix (5mM) = 0,5 μL/*per* pereche de primer ce conține:
ZFY: *F- ACCRCTGTA CTGACTGTGATTACAC*
R- GCACYCTTTGGTATCYGAGAAAGT
SRY: *F- GAATATTC CCGCTCTCCGGA*
R- GCTGGTGCTCCATTCTTGAG
sY254: *F- GGGTGTACCAGAAGGCAAA*
R- GAACCGTATCTACCAAAGCAGC
sY86: *F- GTGACACACAGACTATGCTTC*
R- ACACACAGAGGGACAACCCT
sY127: *F- GGCTCACAAACGAAAAGAAA*
R- CTGCAGGCAGTAATAAGGGA
- 20 q.Dream Taq polymerase = 0,4 μL
r. ADN extras= 2 μL;
- 25 - pentru al II set de primeri (ZFY, SRY, sY255, sY84, sY134), se prepară mixul de reacție (*per probă*) cu volumul total de 25,5 μL:
- 30 s. 10X 10XKCl și (NH₄)₂SO₄(Dream Taq Green buffer)(+20mM MgCl₂) = 2,5 μL,
t. dNTP (2mM) = 2,5 μL,
u.H₂O= 18 μL
- 35 v.primeri mix (5mM) = 0,5 μL/*per* pereche de primeri ce conține:
ZFY: *F- ACCRCTGTA CTGACTGTGATTACAC*
R- GCACYCTTTGGTATCYGAGAAAGT
SRY: *F- GAATATTC CCGCTCTCCGGA*
R- GCTGGTGCTCCATTCTTGAG
sY255: *F- GTTACAGGATTCGGCGTGAT*
R- CTCGTCATGTGGCAGCCAC
sY84: *F- AGAAGGGTCTGAAAGCAGGT*

R- GCCTACTACCTGGAGGCTTC
sY134: F- GTCTGCCTCACCATAAAACG
R- ACCACTGCCAAAACITTTCAA

w. Dream Taq polymerase = 0,4 µL

5 x.ADN extras= 2 µL;

- pentru al III set de primeri (ZFY, SRY, DBY1, sY117, sY153), se prepară mixul de reacție (per probă) cu volumul total de 25,5 µL:

y. 10XKCl și (NH₄)₂SO₄(Dream Taq Green buffer) (+20mM MgCl₂) = 2,5 µL,

z.dNTP (2mM) = 2,5 µL,

10 aa. H₂O= 18 µL

bb. primeri mix (5mM) = 0,5 µL/per pereche de primeri ce conține:

ZFY: F- ACCRCTGACTGACTGTGATTACAC

R- GCACYTCTTTGGTATCYGAGAAAAGT

SRY: F- GAATATTCCCGCTCTCCGGA

15 R- GCTGGTGCTCCATTCTTGAG

DBY1: F- TATTGGCAATCGTGAAAGAC

R-TGCCGGTTGCCTCTACTGGT

sY117: F- GTTGGTCCATGCTCCATAC

R- CAGGGAGAGAGCCTTTTACC

20 sY153: F- GCATCCTCATTTTATGTCCA

R- CAACCCAAAAGCACTGAGTA

cc. Dream Taq polymerase = 0,4 µL

dd. ADN extras= 2 µL,

25 - pentru al IV set de primeri (ZFY, SRY, sY620,sY143, sY158), se prepară mixul de reacție (per probă) cu volumul total de 25,5 µL:

ee. 10X 10XKCl și (NH₄)₂SO₄(Dream Taq Green buffer)(+20mM MgCl₂) = 2,5 µL,

ff. dNTP (2mM) = 2,5 µL,

gg. H₂O= 18 µL

hh. primeri mix (5mM) = 0,5 µL/per pereche de primeri ce conține:

30 ZFY: F- ACCRCTGACTGACTGTGATTACAC

R- GCACYTCTTTGGTATCYGAGAAAAGT

SRY: F- GAATATTCCCGCTCTCCGGA

R- GCTGGTGCTCCATTCTTGAG

sY620: F- GGCTGATATATTTAACC

35 R- ACTCAAACAACACAGTC

sY143: F- GCAGGATGAGAAGCAGGTAG

R- CCGTGTGCTGGAGACTAATC

sY158: F-CTCAGAAGTCCTCCTAATAGTTCC

R- ACAGTGGTTTGTAGCGGGTA

40 ii. Dream Taq polymerase = 0,4 µL

jj. ADN extras= 2 µL;

- în eprubeta marcată cu „K1”, se adaugă 2 µL ADN cu genotipul cunoscut- control pozitiv (XX), cu „K2”, se adaugă 2 µL ADN cu genotipul cunoscut- control pozitiv masculin-norma, iar în eprubeta marcată cu „K-” nu se introduce niciun ADN;

45 - toate probele se introduc în termociclul “Biometra” și se introduce regimul de amplificare (tab. 6).

Programul de amplificare a termociclului “Biometra”

Tabelul 6

Ciclul	Temperatura, °C	Timpul	Numărul de repetări ale ciclurilor
1	95	3 min	1
2	94	30 sec	33
	59	45 sec	
	72	50 sec	
3	72	5 min	1
4	16	fără limită	1

50 Analiza prin electroforeză a ADN-ului amplificat.

MD 1489 Y 2021.01.31

18

Fragmentele amplificate de ADN sunt analizate prin metoda separării electroforetice sub influența unui curent electric continuu într-un sistem-tampon continuu. ADN-ul este separat în gel de poliacrilamidă de 8%. În calitate de sistem-tampon de migrare se utilizează TBE 1X cu pH=8,0.

Pentru prepararea soluției de TBE 10X se utilizează:

- 5) 21,6 g 2-amino-2-(hidroximetil)-1,3-propanediol
- 6) 11,0 g de borat
- 7) 8 ml EDTA (0,5 M)
- 8) H₂O până la 200 mL.

Pentru obținerea soluției de TBE 1X, soluția inițială se diluează de 10 ori.

- 10 Prima etapă constă în efectuarea electroforezei cu asamblarea matriței, care este alcătuită din 2 plăci de sticlă și 2 distanțiere din material plastic.

Pentru prepararea gelului de poliacrilamidă de 8% se utilizează următoarele componente:

- 6) acrilamidă/bis-acrilamidă 30% - 10,6 mL
- 7) TBE 10X = 4 mL
- 15 8) PSA 10%= 400 μL
- 9) TEMED=40 μL
- 10) H₂O până la 40 mL

Matricea cu gelul preparat se introduce în cuva aparatului de electroforeză cu electrozii de platină asamblați; se umple cu soluția-tampon de migrare rezervoarele superior și inferior. Electrozii se conectează la sursa de curent continuu la 100 V -35 mA- 30 min, apoi 200 V-70mA- 4 ore. Preelectroforeza durează 15 min, după care se stopează sursa de curent și se sondează probele de ampliconi (7,5 μL) în gel împreună cu un marker cu greutatea de 50 perechi de baze. Se conectează repetat sursa de curent electric.

- 20 După migrare se deconectează cuva aparatului de electroforeză de la sursa de curent continuu, se detașează și se dezassemblează matricea, iar gelul obținut este supus operațiunilor de colorare în soluție de bromură de etidium (C = 0,5 μg/mL), timp de 5 min. Gelul se spală cu apă, timp de 1 min și este fotodocumentat la aparatul UV SOLO. În urma vizualizării se obține următoarele fragmente, conform (tab. 7).

Tabelul 7

Control (XX)	Control XY (norma) I set	Control XY (norma) II set	Control XY (norma) III set	Control XY (norma) IV set	Control negativ
ZFY-495 pb.	ZFY : 495 bp	ZFY : 495 bp	ZFY : 495 bp	ZFY : 495 bp	
	SRY : 472 bp	SRY : 472 bp	SRY : 472 bp	SRY : 472 bp	
	sY254 : 400 bp (AZFc)	sY84 : 326 bp (AZFa)	DBY1 : 277 bp (AZFa)	sY620 : 249 bp (AZFa)	
	sY86 : 320 bp (AZFa)	sY134 : 301 bp (AZFb)	sY117 : 262 bp (AZFb)	sY143 : 311 bp (AZFb)	
	sY127 : 274 bp (AZFb)	sY255 : 126 bp (AZFc)	sY153 : 139 bp (AZFc)	sY158 : 231 bp (AZFc)	

30

Exemple de realizare a invenției.

Exemplul 1

Pacientul, nr. 62, vârsta 36 ani, anamneza masculină (date generale, anamneza familială, a fertilității, pubertară, uroo-genitală, sexuală, prezența maladiilor iatrogene), infertilitate în cuplu de 8

- 35 ani, hipogonadism.

Spermograma

Tabelul 8

Parametri	Rezultate	Valori de referință
Abstința (zile)	6	3...7 zile
Recoltare (completă, parțială)	comp.	
Volum(ml)	165	≥ 1,5 mL
Culoare	norm.	≤2 cm
Timp de lichifiere	40	≤60 min
Viscozitate	norm.	2 cm

PH	765	≥7,2
Leucocite	-	≤ 1,0mln/mL
Concentrația spermatozoizilor (mln/mL)	0	≥ 1,5 mL
Nr. total de spermatozoizi (mln/ejaculat)	-	≥ 39 mln
Mobilitate progresivă (%)	-	≥ 32%
Concentrația spermatozoizilor mobili (mln/mL)	-	≥ 10 mln/mL
Nr. Total de spermatozoizi mobili (mln/ejaculat)	-	≥ 15 mln
Concentrația spermatozoizilor funcționali (mln/mL)	-	≥ 7 mln/mL
Nr total de spermatozoizi funcționali (mln/ejaculat)	-	≥10,5 mln/mL
Indexul motilității	-	≥ 80
Forme normale (%)	-	≥4%
Viabilitate (%)	-	≥ 58

Concluzie: azoospermie

Examenul profilului hormonal

Tabelul 9

Deumirea analizei	Rezultat	Valori de referita	Unitați de măsură
Hormonul foliculostimulant (FSH)	6,9	2,0...10,0	mIU/mL
Hormonul luteinizant (LH)	8,4	3,0...12,0	mIU/mL
Prolactina	8,2	1,8...17,0	ng/mL
Estradiol		10...94	pg/mL
Testosteron	3,0	2,0...6,9	ng/mL
TSH (hormoul de stimulare tiroidiană)	1,3	0,3...4,0	mIU/mL

5

Diagnosticul molecular-genetic pentru CFTR (soțul)

Tabelul 10

Gena	Mutația	Polimorfismul	Rezultatul	Cifrul
CFTR	delF508	N/N N/delF508 delF508/ delF508	N/ N	1
	G542X	G/G G/T T/T	G/G	1

1-homozigot după alela normală, 2-heterozigot, 3-homozigot după alela mutantă.

MD 1489 Y 2021.01.31

20

Diagnosticul molecular-genetic pentru micodelețiile din regiunea AZF Tabelul 11

STS	Regiunea crs. Y	Locus	Secvența primer	Rezultatul
SY14	Yp	ZFY	F- ACCRCTGTA CTGACTGTGATTACAC R- GCACYTCTTTGGTATCYGAGAAAGT	+
SY14	Yp	SRY	F- GAATATTC CCGCTCTCCGGA R- GCTGGTGCTCCATTCTGAG	+
sY84	AZFa	DYS 388	F- AGAAGGGTCTGAAAGCAGGT R- GCCTACTACCTGGAGGCTTC	+
sY86		DYS148	F- GTGACACACAGACTATGCTTC R- ACACACAGAGGGACAACCCT	+
DBY1		DBY	F- TATTGGCAATCGTGAAAGAC R-TGCCGGTTGCCTCTACTGGT	+
sY620		USP9Y	F- GGCTGATATATTTAACC R- ACTCAAAAACAACACAGTC	+
sY127	AZFb	DYS218	F- GGCTCACAAACGAAAAGAAA R- CTGCAGGCAGTAATAAGGGA	-
sY134		DYS224	F- GTCTGCCTCACCATAAAACG R- ACCACTGCCAAAACCTTCAA	-
sY117		DYS209	F- GTTGGTTCCATGCTCCATAC R- CAGGGAGAGAGCCTTTTACC	-
sY143		RBM1	F- GCAGGATGAGAAGCAGGTAG R- CCGTGTGCTGGAGACTAATC	-
sY153	AZFc	DYS237	F- GCATCCTCATTTTATGTCCA R- CAACCCAAAAGCACTGAGTA	-
SY158		DYS237	F-CTCAGAAGTCCTCCTAATAGTTCC R- ACAGTGGTTTGTAGCGGGTA	-
sY254		DAZ	F- GGGTGTACCAGAAGGCAAA R- GAACCGTATCTACCAAAGCAGC	-
sY255		DAZ	F- GTTACAGGATTCGGCGTGAT R- CTCGTCATGTGGCAGCCAC	-

Exemplul 2

Pacientul, nr 12, vârsta 40 ani, anamneza masculină (date generale, anamneza familială, a fertilității, pubertară, uro-genitală, sexuală, prezența de maladii iatrogene), infertilitate în cuplu de 10 ani.

Spermograma

Tabelul 12

Parametri	Rezultate	Valori de referință
Abstinența (zile)	6	3...7 zile
Recoltare (completă, parțială)	comp.	
Volum(mL)	2,8	≥ 1,5 mL
Culoare	norm.	≤2 cm
Timp de lichifiere	30	≤60 min
Viscozitate	norm.	2 cm
PH	7,9	≥7,2
Leucocite	1,0	≤ 1,0mln/mL
Concentrația spermatozoizilor (mln/mL)	0	≥ 1,5 mL
Nr total de spermatozoizi (mln/ejaculat)	-	≥ 39 mln
Mobilitate progresivă (%)	-	≥ 32%
Concentrația spermatozoizilor mobili (mln/mL)	-	≥ 10 mln/mL
Nr. Total de spermatozoizi mobili (mln/ejaculat)	-	≥ 15 mln
Concentrația spermatozoizilor funcționali (mln/mL)	-	≥ 7 mln/mL
Nr. total de spermatozoizi funcționali (mln/ejaculat)	-	≥ 10,5 mln/mL
Indexul motilității	-	≥ 80

MD 1489 Y 2021.01.31

21

Forme normale(%)	-	≥4%
Viabilitate (9%)	-	≥ 58

Concluzie: Azoospermie

Examenul profilului hormonal

Tabelul 13

Denumirea analizei	Rezultat	Valori de referință	Unități de măsură
Hormonul foliculostimulant (FSH)	9,8	2,0...10,0	mIU/mL
Hormonul luteinizant (LH)	7,7	3,0...12,0	mIU/mL
Prolactina	7,0	1,8...17,0	ng/mL
Estradiol		10...94	pg/mL
Testosteron	4,1	2,0...6,9	ng/mL

5

Diagnosticul molecular-genetic pentru CFTR (soțul)

Tabelul 14

Gena	Mutația	Polimorfismul	Rezultatul	Cifru
CFTR	delF508	N/N N/delF508 delF508/ delF508	N/ N	1
	G542X	G/G G/T T/T	G/G	1

1-homozigot după alela normală, 2-heterozigot, 3-homozigot după alela mutantă.

10

Diagnosticul molecular-genetic pentru microdelețiile din regiunea AZF

Tabelul 15

STS	Regiunea crs.Y	Locus	Secvența primer	Rezultatul
SY14	Yp	ZFY	F- ACCRCTGACTGACTGTGATTACAC R- GCACYTCTTTGGTATCYGAGAAAGT	+
SY14	Yp	SRY	F- GAATATTCCCGCTCTCCGGA R- GCTGGTGCTCCATTCTTGAG	+
sY84	AZFa	DYS 388	F- AGAAGGGTCTGAAAGCAGGT R- GCCTACTACCTGGAGGCTTC	-
sY86		DYS148	F- GTGACACACAGACTATGCTTC R- ACACACAGAGGGACAACCCT	-
DBY1		DBY	F- TATTGGCAATCGTGAAAGAC R-TGCCGGTTGCCTCTACTGGT	-
sY620		USP9Y	F- GGCTGATATATTTAACC R- ACTCAAAAACAACACAGTC	-
sY127	AZFb	DYS218	F- GGCTCACAACGAAAAGAAA R- CTGCAGGCAGTAATAAGGGA	-
sY134		DYS224	F- GTCTGCCTCACCATAAAACG R- ACCACTGCCAAAACITTC	-
sY117		DYS209	F- GTTGGTTCCATGCTCCATAC R- CAGGGAGAGAGCCTTTTACC	-
sY143		RBM1	F- GCAGGATGAGAAGCAGGTAG R- CCGTGTGCTGGAGACTAATC	-
sY153	AZFc	DYS237	F- GCATCCTCATTTTATGTCCA R- CAACCCAAAAGCACTGAGTA	-
SY158		DYS237	F-CTCAGAAGTCTCTAATAGTCC R- ACAGTGGTTTGTAGCGGGTA	-
sY254		DAZ	F- GGGTGTACCAGAAGGCAAA R- GAACCGTATCTACCAAAGCAGC	-
sY255		DAZ	F- GTTACAGGATTCGGCGTGAT R- CTCGTCATGTGGCAGCCAC	-

(56) Referințe bibliografice citate în descriere:

1. Seifer I., Amat S., Delgado-Viscogliosi P., Boucher D., Bignon Y.J. Screening for microdeletions on the long arm of chromosome Y in 53 infertile men. *Int. J. Androl.*, no 22(3), 1999, p. 148-154

(57) Revendicări:

1. Metodă molecular-genetică pentru depistarea microdelețiilor cromozomului Y în infertilitatea masculină, care constă în aceea că se efectuează analiza ADN-ului genomic izolat cu utilizarea reacției de polimerizare în lanț, cu analiza secvențelor sY84 și sY86 (AZFa), sY127 și sY134 (AZFb), sY254 și sY255 (AZFc) și SRY și ZFX/ZFY, sDBY1 și sY620 (AZFa), sY153 și sY158 (AZFc), sY117 și sY143 (AZFb), se efectuează amplificarea fragmentelor de ADN, după care ADN-ul se separă prin metoda electroforetică sub influența unui curent electric continuu în gel de poliacrilamidă de 8% într-un sistem-tampon continuu, apoi gelul se colorează cu o soluție de bromură de etidium cu concentrația de 0,5 μg/mL, timp de 5 min, se spală timp de 1 min, și se fotodocumentează fragmentele obținute.

2. Metodă, conform revendicării 1, în care genele secvențelor analizate sunt sDBY1 - gena DBY, sY620 - gena USP9Y, sY153 - gena DYS237, sY158 - gena DYS241, sY117 - gena DYS209, sY143 - gena RBM1.

3. Metodă, conform revendicării 1, în care amorsele specifice, utilizate pentru amestecul multiplex, și lungimile produselor pentru reacția de polimerizare în lanț sunt:

STS	Regiunea crs.Y	Locus	Secvența primer
SY14	Yp	ZFY	<i>F- ACCRCTGTACTGACTGTGATTACAC</i> <i>R-GCACYTCTTTGGTATCYGAGAAAGT</i>
SY14	Yp	SRY	<i>F- GAATATTCCCCTCTCCGGA</i> <i>R- GCTGGTGCTCCATTCTTGAG</i>
sY84	AZFa	DYS388	<i>F- AGAAGGGTCTGAAAGCAGGT</i> <i>R- GCCTACTACCTGGAGGCTTC</i>
sY86		DYS148	<i>F- GTGACACACAGACTATGCTTC</i> <i>R- ACACACAGAGGGACAACCCCT</i>
DBY1		DBY	<i>F- TATTGGCAATCGTGAAAGAC</i> <i>R-TGCCGGTTGCCTCTACTGGT</i>
sY620		USP9Y	<i>F- GGCTGATATATTTAACC</i> <i>R- ACTCAAACAACACAGTC</i>
sY127	AZFb	DYS218	<i>F- GGCTCACAACGAAAAGAAA</i> <i>R- CTGCAGGCAGTAATAAGGGA</i>
sY134		DYS224	<i>F- GTCTGCCTCACCATAAAAACG</i> <i>R- ACCACTGCCAAAACTTTCAA</i>
sY117		DYS209	<i>F- GTTGGTTCCATGCTCCATAC</i> <i>R- CAGGGAGAGAGCCTTTTACC</i>
sY143		RBM1	<i>F- GCAGGATGAGAAGCAGGTAG</i> <i>R- CCGTGTGCTGGAGACTAATC</i>

MD 1489 Y 2021.01.31

23

sY254	AZFc	DAZ	<i>F- GGGTGTACCAGAAGGCAA R- GAACCGTATCTACCAAAGCAGC</i>
sY255		DAZ	<i>F- GTTACAGGATTCGGCGTGAT R- CTCGTCATGTGGCAGCCAC</i>
sY153		DYS237	<i>F- GCATCCTCATTTTATGTCCA R- CAACCCAAAAGCACTGAGTA</i>
sY158		DYS241	<i>F-CTCAGAAGTCCTCCTAATAGTTCC R- ACAGTGGTTTGTAGCGGGTA</i>

4. Metodă, conform revendicării 1, în care în calitate de sistem-tampon contiuu se utilizează TBE 1X cu pH=8,0.

