

ПОИСК АССОЦИАЦИЙ ПОЛИМОРФИЗМОВ ГЕНОВ ФОЛАТНОГО ЦИКЛА С МУЖСКИМ БЕСПЛОДИЕМ У ЖИТЕЛЕЙ САМАРСКОЙ ОБЛАСТИ

Кокорев Д.А., Карпова М.В., Исакова Н.В., Щелочков А.М.

*Самарский государственный медицинский университет,
кафедра общей и клинической патологии, кафедра репродуктивной медицины,
клинической эмбриологии и генетики, г. Самара*

Ключевые слова: спермограмма, гены фолатного обмена, MTHFR, мужское бесплодие

Резюме: целью исследования является изучение вклада полиморфизмов гена MTHFR (C677T и A1298C) в формирование патоспермии (мужского бесплодия). Согласно данным нашего исследования, удалось установить зависимость морфологии сперматозоидов от наличия полиморфизмов гена MTHFR. Выявлена ассоциативная связь мутантных аллелей 677T и 1298C гена MTHFR с тератоспермией

Resume: the aim of the study is to study the contribution of the MTHFR gene polymorphisms (C677T and A1298C) to the formation of pathospermia (male infertility). According to the data of our study, it was possible to establish the dependence of sperm morphology on the presence of MTHFR gene polymorphisms. An associative relationship of 677T and 1298C mutant alleles of the MTHFR gene with teratospermia was revealed.

Актуальность. По данным международной статистики, в среднем у одной из 4-5 пар есть проблемы с репродуктивным здоровьем. Эти проблемы равномерно распределены между мужчинами и женщинами. Роль изолированного мужского фактора в супружеском бесплодии сложно определить, так как это может быть замаскировано факторами, ассоциированными с проблемами женщины. В конечном счете, проблемы с репродуктивным здоровьем мужчин представляет 50-70% случаев супружеского бесплодия [1]. Генетические аномалии являются причиной 15-30% случаев мужского бесплодия [2] и главным образом представлены хромосомными aberrациями, микроделециями Y-хромосомы и специфическими мутациями в гене MTHFR. В данный момент много исследований направлено на поиск других генетических причин мужского бесплодия [3]. Неблагоприятные генетические полиморфизмы в важных генах могут отразиться на процессе сперматогенеза. Одним из возможных кандидатов на роль генетической предрасположенности к бесплодию является ген MTHFR [2], несмотря на то, что исследования, направленные на изучение эффекта полиморфизмов MTHFR на мужское бесплодие, недостаточны и спорны.

Ген MTHFR, состоящий из 11 экзонов и расположенный на коротком плече 1 хромосомы (1p36.3), кодирует фермент 5,10-метилентетрагидрофолатредуктазу [4, 5]. Существуют 2 основных полиморфизма гена MTHFR: MTHFR C677T (rs1801133), который проявляется в замене аланина на валин в кодоне 222, и MTHFR A1298C (rs1801131), результатом которого является замена глутамина на аланин в кодоне 429. Имеются данные о полиморфизме 1793G>A, который проявляется в замене аргинина на глутамин в кодоне 594 [6].

Фермент метилентетрагидрофолатредуктаза является ключевым ферментом в фолатном метаболизме, является важнейшим фактором, обеспечивающим процессы

метиляции и репарации ДНК и сперматогенеза. МТНFR катализирует превращение 5,10-метилентетрагидрофолата в его биологически активную форму в виде 5-метилтетрагидрофолата, используемого в одноуглеродном опосредованном фолатом метаболическом цикле.

1-СC восстанавливает гомоцистеин с образованием метионина и затем S-аденозил-метионина, универсального эффектора метилирования. МТНFR 677C>T полиморфизм уменьшает активность фермента на $\frac{1}{3}$ у гетерозиготных носителей (СТ) и на $\frac{2}{3}$ у гомозиготных носителей (ТТ) [1], вследствие замещения аланина на валин в белке МТНFR, что ведет к повышению термолабильности и уменьшению активности этого фермента [3]. Внесение изменений в любой ферментный путь фолатного цикла может привести к генетическим или эпигенетическим aberrациям, так как для безошибочного синтеза, метилирования и репарации ДНК, баланс дезоксирибонуклеотидов поддерживается именно циклом метаболизма фолиевой кислоты [7].

Метилирование играет ключевую роль в образовании сперматогониев и дифференциации. Впоследствии, тестикулярные сперматозоиды бесплодных мужчин с нарушенным сперматогенезом несут дефекты метилирования. Обнаружена достоверная связь между ошибками при метилировании и нарушенным сперматогенезом и влиянием на эмбриональное развитие.

Нарушение целостности хроматина может быть ассоциировано с гипометилированием спермальной ДНК. Метилирование и ацетилирование - 2 главных посттрансляционных эффектора, участвующие в обеспечении правильной структуры ядра; отметки метилирования расположены на ДНК и гистонах, регулируя эпигенетические процессы. Поэтому неудивительно, что полиморфизмы МТНFR влияют на этот процесс и оказывают общий эффект на качество сперматогенеза. Внесение изменений в 1-СC с последующим неполным метилированием оказывает эффект на третичную структуру и конденсацию ядра сперматозоида. Гомозиготные носители МТНFR С677Т более подвержены этому риску, чем гетерозиготные носители. Это подтверждает и возможно объясняет выводы многих исследований, которые поддерживают связь между МТНFR С677Т аллелем и идиопатическим мужским бесплодием. Третичная структура ядра сперматозоида очень важна для правильной синхронизации во время процесса оплодотворения и во время раннего преимплантационного периода [1].

Цель: изучить распределение полиморфизмов С677Т (rs1801133) и А1298С (rs1801131) гена МТНFR среди бесплодных и фертильных мужчин Самарской области и выявить возможную ассоциацию этих полиморфизмов с риском развития патоспермии.

Задачи: 1. Исследовать структуру носительства различных вариантов генотипов, кодирующих ключевые ферменты фолатного цикла 2. Установить корреляцию наличия мутантных вариантов с патологическими показателями спермограммы 3. Определить частоту встречаемости мутантных аллелей 677Т и 1298С в исследуемой популяции жителей Самарской области.

Материал и методы. Проведен анализ данных 110 пациентов, обратившихся в клинику “Мать и Дитя” в 2019-2020 гг. для обследования по профилю репродуктивного здоровья. Для рассмотрения влияния вариантов аллелей гена на

фертильность выбраны такие показатели спермограммы как «концентрация», «класс подвижности PR» и «морфология». Биологическим материалом для исследования послужила сперма пациентов, из которой была выделена ДНК, и произведено её исследование на обнаружение мутаций гена MTHFR 677 C>T и 1298 A>C с помощью метода ПЦР в реальном времени (qRT-PCR). Комплект реагентов для выделения ДНК - «Проба-Рapid-Генетика» и β-меркаптоэтанол, для постановки ПЦР – «Генетика метаболизма фолатов». Для определения концентрации сперматозоидов использована счетная камера Горяева. Для оценки процентного содержания клеток определенного класса подвижности и получения количественных данных по кинетике сперматозоидов проведен компьютерный анализ эякулята (CASA). Исследование морфологии проводилось с помощью микроскопического метода (окрашивание по Папаниколау). Для статистического анализа использовалось программное обеспечение MS Excel и IBM SPSS Statistics 23. Данные проверялись на нормальность распределения с помощью критерия Колмогорова-Смирнова. Так как не все выборки прошли проверку на нормальность, межгрупповые различия анализировали с применением Н-критерия Краскела-Уоллиса. Для определения групп, которые значимо отличаются друг от друга, группы тестировались попарно по U-критерию Манна-Уитни. Корреляционный анализ был проведен с помощью коэффициента ранговой корреляции Спирмена (ρ). Различия считались значимыми при значении $p < 0,05$.

Результаты и их обсуждение. Исследуемые пациенты были разделены на 3 группы, в зависимости от полиморфизмов гена MTHFR в 677 и 1298 положениях: CC-AA (n=23), CC-AC/CT-AA (n=48) и CT-AC/TT-AA/CC-CC (n=39). Межгрупповые различия по «концентрации» ($p=0,320$, $\rho=-0,08$), «классу подвижности PR» ($p=0,827$, $\rho=-0,039$) оказались статистически незначимы ($p > 0,05$). Межгрупповые различия по «морфологии сперматозоидов» оказались статистически значимыми, была установлена корреляция средней силы ($p=0,04$, $\rho=-0,407$) (рис. 1).

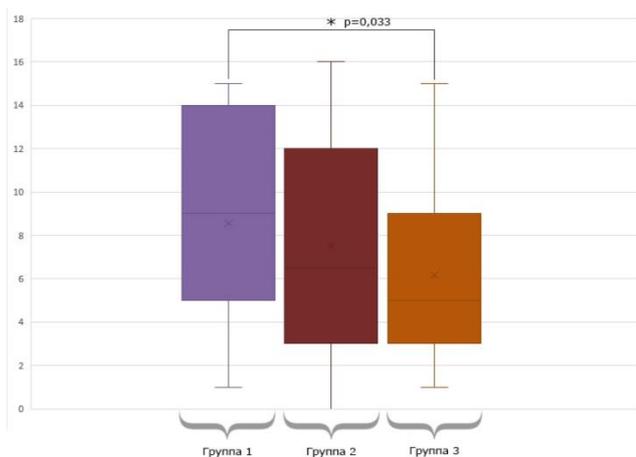


Рис. 1 – Диаграмма «boxplot», отображающая статистическую значимость межгрупповых различий по морфологии сперматозоидов

В результате попарного межгруппового анализа были выявлены статистически значимые различия между 1 исследуемой группой (CC-AA, wt) и 3 исследуемой группой (CT-AC/TT-AA/CC-CC) по параметру «морфология»

($p=0,033$). Частота мутантного аллеля 677Т в исследуемой популяции составила 30%, частота 1298С составила 27, 27%.

Выводы:

1. Выявлена ассоциативная связь мутантных аллелей 677Т и 1298С гена МТНFR с тератоспермией (нарушением морфологии сперматозоидов). Это позволяет рекомендовать проведение молекулярно-генетических исследований с целью выявления носителей данного аллеля среди пациентов с тератоспермией.

2. Распространение мутантных аллелей у жителей Самарской области на примере полиморфизма 677Т (30%) оказалось выше, нежели в популяции центральных (29%), но ниже, чем в сибирских (32%) регионах РФ [8].

Литература

1.Cornet D, Cohen M, Clement A, Amar E, Fournols L, Clement P, Neveux P, Ménézo Y. Association between the МТНFR-C677Т isoform and structure of sperm DNA. *J Assist Reprod Genet.* 2017 Oct;34(10):1283-1288. doi: 10.1007/s10815-017-1015-2.

2.Karimian, Mohammad & Colagar, Abasalt. (2014). Association of C677Т transition of the human methylenetetrahydrofolate reductase (МТНFR) gene with male infertility. *Reproduction Fertility and Development.* 10.1071/RD14186.

3.Stuppia L, Gatta V, Scarciolla O, Colosimo A, Guanciali-Franchi P, Calabrese G, Palka G. The methylenetetrahydrofolate reductase (МТНFR) C677Т polymorphism and male infertility in Italy. *J Endocrinol Invest.* 2003 Jul;26(7):620-2. doi: 10.1007/BF03347018.

4.Kurzawski M., Wajda A., Malinowski D., Kazienko A., Kurzawa R., Drozdziak M. Association study of folate-related enzymes (МТНFR, МTR, МТRR) genetic variants with non-obstructive male infertility in a Polish population. *Genetics and Molecular Biology.* 2015;38(1):42–47. Doi: 10.1371/journal.pone.0022277.

5.Yang Y., Luo Y.Y., Wu S., Tang Y.D., Rao X.D., Xiong L., Tan M., Deng M.Z., Liu H. Association between C677Т and A1298С polymorphisms of the МТНFR gene and risk of male infertility: a meta-analysis. *Genetics and Molecular Research.* 2016;15(2):gmr.15027631. Doi: 10.4238/gmr.15027631.

6.Safarinejad MR, Shafiei N, Safarinejad S. Relationship between genetic polymorphisms of methylenetetrahydrofolate reductase (C677Т, A1298С, and G1793A) as risk factors for idiopathic male infertility. *Reprod Sci.* 2011 Mar;18(3):304-15. doi: 10.1177/1933719110385135.

7.Naqvi H, Hussain SR, Ahmad MK, Mahdi F, Jaiswar SP, Shankhwar SN, Mahdi AA. Role of 677С→Т polymorphism a single substitution in methylenetetrahydrofolate reductase (МТНFR) gene in North Indian infertile men. *Mol Biol Rep.* 2014 Feb;41(2):573-9. doi: 10.1007/s11033-013-2894-7.

8.Добролюбов А. С., Липин М. А., Поляков А. В., Фетисова И. Н. Полиморфизм генов фолатного обмена и болезни человека // ВНМТ. 2006 №4.