Аллельные полиморфизмы генов фолатного обмена у мужчин со сниженной репродуктивной функцией

Д.м.н., проф. А.М. ФЕСЬКОВ, к.м.н. И.А. ФЕСЬКОВА, Е.С. ЖИЛКОВА, Е.В. ЕГУНЬКОВА

Центр репродукции человека «Клиника профессора А.М. Феськова», Харьков

Исследована связь между нарушением мейоза в ходе сперматогенеза и особенностями полиморфизмов генов фолатного обмена MTHFR (C677T, A1298C), MTRR (A66G) у мужчин со сниженной репродуктивной функцией. Доказана связь между генетически обусловленным нарушением процессов фолатного обмена и наличием численных хромосомных нарушений в мужских половых клетках (p<0,05).

Ключевые слова: ПЦР в реальном времени, гены MTHFR и MTRR, анеуплоидии, FISH.

В последнее время в мире актуальным становится изучение причин снижения репродуктивной функции у мужчин. Следует отметить, что по статистике практически в 40% случаев причиной бесплодия супружеских пар является мужской фактор. Снижение репродуктивной функции у мужчин в 15% случаев обусловлено генетическим фактором [1]. Нарушение процесса сперматогенеза на разных его стадиях может привести к нарушению целостности ДНК или наличию хромосомных отклонений в ядрах сперматозоидов. Причиной нерасхождения хромосом при формировании зрелых мужских половых клеток и фрагментации ДНК сперматозоидов может быть нарушение фолатного обмена [2]. Фолатный обмен является одним из ключевых биохимических циклов в организме. Процессы, происходящие в каскадном превращении фолатов, играют важную роль в функционировании ДНК, дезинтоксикации генотоксичных веществ и т.д. Гены фолатного обмена, исследование которых представляет интерес для выявления причин бесплодия: 5,10-метилентетрагидрофолат-редуктаза (*MTHFR*), метионин-синтаза (*MTR*), метионин-синтаза-редуктаза (*MTRR*). Существует ряд аллельных вариантов гена *MTHFR*, вызывающих тяжелую недостаточность фермента, но большинство из этих вариантов редки. Практическое значение имеют два полиморфизма: C677T в экзоне 4 и A1298C в экзоне 7. Наименее изученными из генов фолатного обмена являются гены *MTRR A66G, MTR A2756G* [3].

Цель настоящего исследования — на основании комплексного генетического обследования мужчин со сниженной репродуктивной функцией исследовать связь между нарушением мейоза и нарушением целостности ДНК сперматозоидов в ходе сперматогенеза и особенностями полиморфизмов генов фолатного обмена *MTHFR* (*C677T, A1298C*), *MTRR* (*A66G*).

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

Проведено комплексное генетическое обследование 107 пациентов в рамках программы лечения бесплодия методом ВРТ. Материалом исследования для дальнейшего анализа были лейкоциты периферической крови. Для выделения ДНК из лейкоцитов был использован общепринятый метод [4]. Анализ однонуклеотидных полиморфизмов (single nucleotide polymorphisms, SNP) генов *MTHFR* (*C677T, A1298C*), *MTRR* (*A66G*) был проведен с помощью полимеразной цепной реакции в реальном времени (ПЦР-РВ), которую проводили на термоциклере ABI PRISM 7500 («Applied Biosystems», США) при следующих температурных и временных параметрах: начальная инкубация для денатурации ДНК-матрицы и активации FastStart Taq ДНК-полимеразы: 95 °С, 8 мин; денатурация: 95 °С, 15 с; отжиг: при 60 °С — 2 мин; число циклов — 40. Для проведения ПЦР-РВ использовали универсальный набор реагентов TaqMan Environmental Master mix фирмы «Applied Biosystems» (США), в состав которого входит референсный краситель ROX (6'-карбокси-Х-родамин). ПЦР-РВ проводили в объеме реакционной смеси 25 мкл, включая 12 мкл буфера TaqMan, 0,8 мкмоль каждого праймера, 0,07 мкмоль специфической пробы и 5 мкл ДНК [5]. Общее время амплификации составило 1 ч 32 мин.

Для выявления анеуплоидий в ядрах сперматозоидов по хромосомам 13, 16, 18, 21, X, Y был применен метод флюоресцентной гибридизации *in situ* (fluorescence hybridization in situ, FISH). Для проведения исследования сперма изначально была отмыта с помощью раствора PBS (phosphate buffer saline, «Sigma»). Затем каждый исследуемый образец был зафиксирован с помощью 96% этилового спирта и

e-mail: zhilkova@feskov.com.ua

ледяной уксусной кислоты (3:1). Зафиксированный препарат был выдержан при –20 °С в течение 12—14 ч. Для последующей отмывки и фиксации были использованы растворы 70%, 90% и 96% этанола. Для флюоресцентной гибридизации были применены следующие ДНК-зонды: CEP 16 (D16Z3) Satellite II DNA SpectrumAqua, LSI 13 (13q14) SpectrumGreen, CEP Y (DYZ3) Satellite DNA SpectrumOrange, CEP X (DXZ1) Alpha Satellite DNA SpectrumGreen, CEP 18(D18Z1) Alpha Satellite DNA SpectrumAqua, LSI 21 (loci D21S259, D21S341, D21S342, region 21q22.13-q22.2) SpectrumOrange («Vysis-Abbott», США). С целью денатурации ДНК-препарат с добавленными ДНК-зондами был в течение 10 мин выдержан при 75 °С. Последующая гибридизация ДНК-зонда с ДНК-мишенью занимала 5 ч при 42 °С. Анализ флюоресцентного сигнала был проведен с помощью флюоресцентного микроскопа Nikon Eclipse 80i. В норме содержание анеуплоидных сперматозоидов в эякуляте не должно превышать 1,3% [6]. Полученные данные статистически обработаны с помощью φ-критерия Фишера [7].

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Содержание анеуплоидных сперматозоидов в эякуляте превысило 1,3% у 46 из 107 пациентов. Полиморфные варианты *C677T* в экзоне 4 и *A1298C* в экзоне 7 гена *MTHFR* и полиморфный вариант гена *MTRR A66G* были выявлены в различных сочетаниях у 80 мужчин. У 27 пациентов полиморфные состояния исследуемых генов не выявлены. Среди мужчин с нормальным генотипом высокое содержание анеуплоидных сперматозоидов обнаружено у 22,2% (у 6 из 27 пациентов). Среди носителей полиморфных вариантов исследуемых генов высокое содержание сперматозоидов с хромосомными нарушениями было выявлено у 50,0% (у 40 из 80 пациентов). Результаты приведены в **таблице.**

Фото отдельных анеуплоидных ядер сперматозоидов представлены на **рис. 1, 2**.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Настоящее исследование подтверждает связь между генетически обусловленным нарушением процессов фолатного обмена и наличием численных хромосомных нарушений в мужских половых клетках. Высокое содержание анеуплоидных сперматозоидов значительно чаще выявляется для носителей полиморфных вариантов генов фолатного обмена *MTHFR* (*C677T, A1298C*) и *MTRR* (*A66G*) ($p<0,05$). Анализ полиморфизмов генов фолатного обмена *MTHFR* (*C677T, A1298C*), *MTRR* (*A66G*) необходимо использовать в комплексном генетическом обследовании мужчин со сниженной репродуктивной функцией.

Генотипы полиморфизмов *MTHFR* (*C677T, A1298C*), *MTRR* (*A66G*) у мужчин с высоким (более 1,3%) содержанием анеуплоидных сперматозоидов

Результат исследований на полиморфизмы	Количество мужчин	
	абс.	%
MTHFR: *CC*-генотип, *AA*-генотип *MTRR*: *AA*-генотип	6 (из 27)	22,2
MTHFR: *CT-TT*-генотип *AC-/CC*-генотип *MTRR*: *AA*-генотип	19 (из 36)	52,7
MTHFR: *CT-/TT*-генотип *AC-/CC*-генотип *MTRR*: *GG*-генотип	13 (из 25)	52,0
MTHFR: *CC*-генотип, *AA*-генотип *MTRR*: *GG*-генотип	8 (из 19)	42,1

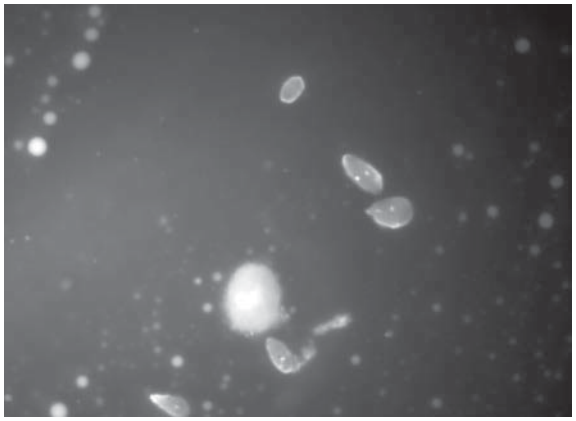

Рис. 1. **Ядро сперматозоида, диплоидного по половым хромосомам.**

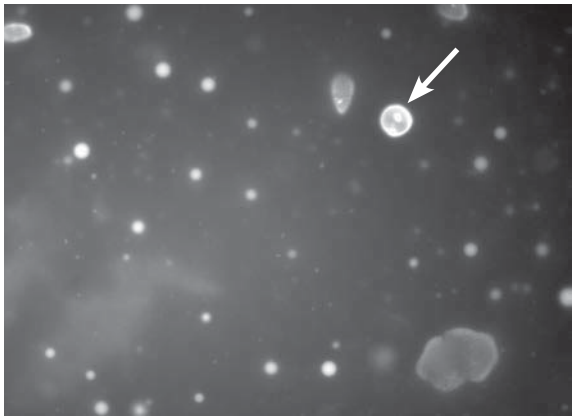

Рис. 2. **Дисомия по хромосоме 18 (стрелка).**

ЛИТЕРАТУРА

1. Экстракорпоральное оплодотворение и его новые направления в лечении женского и мужского бесплодия (теоретические и практические подходы): Руководство для врачей. Под ред. В.И. Кулакова, Б.В. Леонова. 2-е изд., доп. М: МИА 2004; 782.
2. *Daval J.L., Gue´ant J.L., Thierry Forges, Monnier-Barbarino P., Alberto J.M., Gue´ant-Rodriguez R.M.* Impact of folate and homocysteine metabolism on human reproductive health. Human Reprod 2007; 13: 3: 225—238.
3. *Kelton Tremellen*. Oxidative stress and male infertility — a clinical perspective. Human Reprod 2008; 14: 3: 243—258.
4. *Pierce K.E., Rice J.E., Aquiles Sanchez J., Wangh L.J.* Detection of cystic fibrosis alleles from single cell using molecular beacons and a novel method of asymmetric real-time PCR. Mol Human Reprod 2003; 9: 12: 815—820.
5. *Matiezel I., Verheyen G., Van Assche E. et al.* FISH analysis of chromosomes X, Y and 18 abnormalities in testicular sperm from azoospermic patients. Human Reprod 2002; 17: 9: 2249—2257.
6. *Sarah E.D., Sean P.F., Colin D.M.* Detection of chromosomes and estimation of aneuploidy in human spermatozoa using in-situ hybridization. Mol Human Reprod 1997; 3: 7: 585—598.
7. *Гланц С.* Медико-биологическая статистика. М: Практика 1999; 460.