

На правах рукописи

Альхеджой Хасан Мохаммад Хасан

**ГЕНЕТИЧЕСКИЕ АСПЕКТЫ НАРУШЕНИЯ РЕПРОДУКТИВНОЙ
ФУНКЦИИ У МУЖЧИН С ПАТОСПЕРМИЕЙ**

03.02.07 – генетика

АВТОРЕФЕРАТ

**диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук**

Москва-2020

Работа выполнена на кафедре биологии и общей генетики медицинского института Федерального государственного автономного образовательного учреждения высшего образования «Российский университет дружбы народов» (РУДН).

Научный руководитель
доктор биологических наук, профессор **Мяндина Галина Ивановна**

Официальные оппоненты:

Виноградов Игорь Владимирович - доктор медицинских наук, доцент, врач – уролог ООО «Репродуктивные технологии»

Ефремов Евгений Александрович - доктор медицинских наук, профессор руководитель ООО «Профессиональный медицинский центр», Международный Центр Андрологии

Ведущая организация:

Федеральное государственное бюджетное учреждение «Национальный медицинский исследовательский центр акушерства, гинекологии и перинатологии имени академика В.И. Кулакова» Министерства здравоохранения Российской Федерации

Защита диссертации состоится « 24 » февраля 2021 г. в 15.00 на заседании диссертационного совета ПДС 0300.005 при ФГАОУ ВО «Российский университет дружбы народов» (РУДН) по адресу: 117198, ул. Миклухо-Маклая, д.8.

С диссертацией можно ознакомиться в УНИБЦ (Научной библиотеке) ФГАОУ ВО «Российский университет дружбы народов» по адресу: 117198, ул. Миклухо-Маклая, д.6 и на сайте <http://dissovet.rudn.ru>.

Объявление о защите и автореферат диссертации размещены на сайтах <http://vak2.ed.gov.ru> и <http://dissovet.rudn.ru>

Автореферат разослан « ____ » _____ 2021 года

Ученый секретарь
диссертационного совета ПДС 0300.005
кандидат биологических наук, доцент

Гигани Ольга Олеговна

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность проблемы. Бесплодие является одной из наиболее важных проблем в области медицины, демографии и экономики. Частота бесплодных браков составляет от 8% до 29% супружеских пар во всем мире, при этом в Российской Федерации частота бесплодных браков колеблется в диапазоне от 8 до 17,5% [Корнеева И.Е., 2010; Yefremov Ye. A. *et.al.*, 2015., Chalyi M. E., *et.al.*, 2016., Kaprin A. D., *et. al.*, 2009].

Нарушение репродуктивной функции отмечаются у 5–7 % мужчин во всем мире, при этом в 50–60 % случаев бесплодия в браке диагностируется снижение количественных или качественных показателей спермы [Божедомов В.А., 2015; Agarwal A., *et.al.*, 2015; Jodar M., 2017]. Согласно статистическим данным с 2000 по 2018 год в РФ количество зарегистрированных мужчин с бесплодием увеличилось в 2,1 раза, при этом качество спермы у мужчин во всем мире за последнее время снизилось на 50% [Лебедев Г.С., и соавт., 2019; Andrology:Male Reproductive Health, 2010]. Характер нарушений параметров спермограммы у мужчин с бесплодием варьирует в диапазоне от снижения количества сперматозоидов (олигоспермия) в эякуляте до их полного отсутствия (азооспермия). Также различают снижение подвижности сперматозоидов (астенозооспермия) и нарушения их морфологии (тератозооспермия).

Анализ степени изученности проблемы бесплодия у мужчин показывает недостаточный уровень исследований генетических причин патоспермии. В настоящее время генетически доказанными причинами мужского бесплодия, связанного с патоспермией, являются синдром Клайнфельтера, хромосомные мутации, микроделеции хромосомы Y в локусе AZF (Azoospermia Factor, фактор азооспермии), мутации и полиморфизм IVS8-Tn гена муковисцидоза (*CFTR*), увеличение количества CAG-повторов в первом экзоне гена рецептора андрогенов

(*AR/HUMARA*) [Курило Л. Ф. и соавт., 2013; Aston, Conrad, 2013]. Эти генетические факторы определяют порядка 30% всех случаев мужского бесплодия [Bozhedomov V. A., *et.al.*, 2016, Kurilo L. F., 2015], этиология остальных случаев мужского бесплодия остается неизвестной и определяется как идиопатическое [Гамидов С.И. и соавт., 2013; Krausz C., 2011]. Предполагается, что в остальных случаях факторы среды в сочетании с полиморфизмами многих генов оказывают влияние на репродуктивную функцию мужчин, вызывая нарушение сперматогенеза, снижение качества спермы и развития патоспермии у мужчин с бесплодием [Сафина Н.Ю. и соавт., 2018; Aston, 2014; Hotaling, J., Carell D., 2014; Skakkeback N.E., *et.al.*, 2016; Harlev D., *et.al.*, 2015].

К настоящему времени известно, что более 2 300 генов человека вовлечены в процессе регуляции гормонального гомеостаза, пролиферации и дифференцировки половых клеток. [Aston K. I., *et.al.*, 2014., Kruglov D. P., *et.al.*, 2009., Bozhedomov V. A., *et.al.*, 2016., Ferlin A., *et.al.*, 2007]. В первую очередь к ним относятся гены, продукты которых участвуют в клеточном метаболизме и защитных механизмах половых клеток [Garsia Rodrigues A., *et.al.*, 2018]. Повреждение половых клеток вызывает нарушение сложной системы генетической регуляции сперматогенеза, а также такие внутриклеточные факторы как воспаление, оксидативный стресс, профиль метилирования и эпигенетические изменения ДНК.

Нарушения параметров спермограммы, вероятно, определяются полиморфизмами многих генов, участвующих в сперматогенезе [Гончарова Н.Н. и соавт., 2012; Kosova G., *et.al.*, 2014; Schultz N, 2003]. Полиморфные варианты генов оксидативного стресса (каталаза *CAT*, глутатион S-трансфераза *GSTP1*), селенопротеина S1 (*SEPS1*), фосфодиэстеразы (*PDE7B*) и фолатного цикла (*MTHFR*, *MTR* и *MTRR*), вовлеченные в регуляцию сперматогенеза, играют ключевую роль в изучении мужского бесплодия и риска патоспермии.

Генетические вариации в генах, кодирующих синтез ферментов фолатного обмена, селенопротеинов и антиоксидантных систем могут приводить к снижению или нарушению регуляции внутриклеточной ферментативной активности и нарушать детоксикацию активных форм кислорода и, как следствие, способствовать повышению уровня цитокинов, которые вызывают повреждение половых клеток. С этой точки зрения, анализ ассоциации генетических полиморфизмов генов метаболических и антиоксидантных систем в настоящее время является наиболее эффективным направлением изучения идиопатического мужского бесплодия [Черных В.Б. и соавт., 2017].

В настоящее время в литературе имеются сведения об ассоциации генов антиоксидантной защиты [Sabouhi S., *et al*, 2013; Ershova O.A., *et al.*, 2014; NguyenThiTrang., *et al.*, 2018; Garcia-Rodriguez, A. *et al* 2018] и фолатного обмена [Gava M.M., *et al.*, 2011; Gupta N., *et al.* 2011; Wu W., *et al.*, 2012; Mfady D.S., *et al.*, 2014; Kang Liu., *et al.*, 2015; V. Antonio-Véjar., 2014], с мужским бесплодием, однако представленные данные весьма недостаточны и противоречивы [Курашова Н.А. и соавт., 2017; Montjean D., *et al.*, 2011; Kurzawski M., *et al.*, 2016; Ershova O.A., *et. al.*, 2016]. Эти противоречия, возможно, обусловлены этногеографическими различиями популяций, критериями отбора исследуемых лиц, а также аддитивным действием многих полиморфных локусов в генотипе пациента [Безруков Е.А., Проскура А.В., 2016, Paracchini, V., *et. al.*, 2006]. Анализ литературных источников показал, что исследования, направленные на изучения полиморфизмов генов, ассоциированных с развитием мужского бесплодия на фоне патоспермии, среди мужчин Московского региона не проводились.

С появлением молекулярно-генетического тестирования открылась перспектива уточнения генеза бесплодия, обусловленного тяжелыми нарушениями сперматогенеза, причины которого ранее оставались неизвестными [Курило Л.Ф. и соавт., 2011; Lee J.Y. *et.al.*, 2011;

Safarinejad M.R., *et. al.*, 2013], и появилась возможность разработки современных методов вспомогательных репродуктивных технологий (ВРТ), нивелирующих передачу дефектных генов потомству [Гамидов С.И. и соавт., 2017; Stahl P.J., Schlegel P.N., 2012; McLachlan R.I., *et al.*, 2013]. Несмотря на значительные успехи современной медицины в области ВРТ, 3-4% супружеских пар остаются бездетными, а мужское бесплодие по-прежнему остается серьезной клинической и медико-социальной проблемой. Поэтому выявление генов, полиморфизмы которых оказывают влияние на качество спермы и репродуктивную функцию мужчин, является весьма актуальным направлением в плане преодоления бесплодия и улучшения репродуктивного здоровья мужчин.

Цель исследования: изучить ассоциацию полиморфизмов генов фолатного обмена, антиоксидантой защиты, фосфодиэстеразы PDE7B и селенопротеина S1 с развитием патоспермии среди русских мужчин Московского региона с нарушением фертильной функции.

Задачи исследования

1. Изучить распределение полиморфизмов *C677T (rs 1801133)* и *A1298C (rs 1801131)* гена *MTHFR*, *A66G* гена *MTRR (rs 1801394)* и *A2756G* гена *MTR (rs 1805087)* среди бесплодных и фертильных мужчин и выявить возможную ассоциацию этих полиморфизмов с риском развития патоспермии.
2. Выявить возможную ассоциацию полиморфизмов *-262 C>T* гена каталазы *CAT (rs 1001179)* и *G/A* гена фосфодиэстеразы *PDE7B (rs 7774640)* с риском патоспермии у бесплодных мужчин.
3. Провести сравнительный анализ частот полиморфных вариантов гена *GSTP1 (Ile/Val) (A313G; rs1695)* и *GSTP1 (Ala/Val) (C341T; rs1138272)* в подгруппах бесплодных мужчин с разными формами патоспермии и фертильных мужчин.
4. Изучить возможную ассоциацию полиморфизма *G-105A* гена селенопротеина S1 *SEPS1 (rs28665122)* с риском развития

патоспермии у русских мужчин с нарушением фертильной функции.

5. Провести сравнительный анализ частот аллелей и генотипов полиморфных локусов изучаемых генов в подгруппах бесплодных мужчин с разными формами патоспермии.
6. Оценить прогностическую значимость полиморфизмов изучаемых генов в развитии разных форм патоспермии у мужчин с нарушением репродуктивной функции

Научная новизна

Впервые в мире была изучена ассоциация локуса *G-105A* гена *SEPS1* и локуса *A/G* гена *PDE7B* с риском развития патоспермии среди русских мужчин с нарушением фертильной функции. Впервые проанализирована ассоциация локусов *MTHFR C677T*, *MTHFR A1298C*, *MTR A2756G* и *MTRRA66G* с нарушением репродуктивной функции у мужчин с разными формами патоспермии.

Впервые была изучена ассоциация локусов *C262T* гена *CAT*, *105* Ile/Val (*AG*) и *114Ala/Val (CT)* *GSTP1* с разными формами патоспермии среди бесплодных мужчин московского региона.

Теоретическая и практическая значимость исследования

Результаты, полученные в настоящем исследовании, вносят вклад в изучение ассоциации аллельных вариантов генов антиоксидантной защиты (*CAT*, *GSTP1*), селенопротеина S1 (*SEPS1*), фосфодиэстеразы (*PDE7B*) и генов фолатного цикла (*MTHFR*, *MTR* и *MTRR*) с нарушениями параметров спермограммы, а также в понимание молекулярно-генетических основ нарушения сперматогенеза и развития патоспермии у мужчин с нарушением фертильной функции. Дальнейшее изучение роли полиморфизмов генов антиоксидантной защиты, фолатного обмена, а также селенопротеина S1 в этиологии патоспермии будет определять внедрение молекулярно-генетических методов исследований в практическую медицину, а также способствовать

развитию индивидуального подхода к профилактике и лечению мужского бесплодия. Полученные результаты изучения ассоциации полиморфных вариантов генов селенопротеина, фолатного цикла и генов оксидативного стресса с нарушением репродуктивной функции у мужчин с патоспермией можно будет использовать для заключения о репродуктивном потенциале пациента и выбора соответствующей тактики преодоления бесплодия. Результаты исследования указывают на возможность изучения аддитивного эффекта полиморфизма многих генов в развитии идиопатического бесплодия у мужчин с патоспермией для выбора индивидуального подхода к лечению. Данные о частотах аллелей и генотипов по полиморфным локусам изучаемых генов среди русских мужчин московского региона, полученные в настоящем исследовании, вносят вклад в изучение генетических особенностей жителей данного региона.

Положения диссертации, выносимые на защиту

1. Частота аллелей *G-105A* локуса *SEPS1(rs28665122)* у русских мужчин с патоспермией статистически значимо отличаются от частот соответствующих аллелей в контрольной группе фертильных мужчин жителей московского региона и в европейских популяциях (MAF). Полиморфизм *G-105A* гена *SEPS* можно рассматривать как новый генетический фактор прогноза среди мужчин с нарушением репродуктивной функции.
2. Частоты аллелей полиморфного локуса *A/G* гена *PDE7B (rs 7774640)* значимо не отличаются от частот соответствующих аллелей в популяциях европеоидного происхождения и среди фертильных и бесплодных русских мужчин московского региона.
3. Генетические полиморфизмы *A1298C MTHFR (rs 1801131)* и *A2756G MTR (rs 1805087)* ассоциированы с риском развития астенозооспермии и тератозооспермии у мужчин с бесплодием.

4. Генетические полиморфизмы гена *GSTP1*(A313G; rs1695) (C341T; rs1138272) определяют риск развития тератозооспермии и астенозооспермии среди бесплодных мужчин.

Степень достоверности

Научные положения и выводы обоснованы достаточным объемом проведенных исследований, применением современных технологий генотипирования и использованием методов статистической обработки данных, полностью соответствующих поставленным задачам.

Апробация результатов:

Материалы диссертации доложены на научных конференциях: «Конгресс Профессиональной Ассоциации Андрологов России» (Сочи, 2017 г.), «Всероссийский симпозиум "Эколого-физиологические проблемы адаптации"» (г. Рязань, 2017 г.), «XX Международный конгресс "Здоровье и образование в XXI веке"» (г. Москва, 2018 г.), 43-й Международный конгресс FEBS (Прага, 2018 г.) и на заседании кафедры биологии и общей генетики медицинского института РУДН (2020 г.).

Внедрение результатов в практику. Результаты диссертационного исследования внедрены в учебный процесс при изучении дисциплин «Биология», «Биология с основами медицинской генетики» на кафедре биологии и общей генетики медицинского института ФГАОУ ВО «Российский университет дружбы народов».

Личный вклад автора. Лично автором были проведены все этапы работы, включая выделение геномной ДНК из лейкоцитов периферической крови, выполнение всех молекулярно-генетических исследований, статистическую обработку и анализ полученных результатов, а также анализ литературных данных по изучаемой проблеме. Соискателем самостоятельно были подготовлены основные публикации по результатам работы, а также написана рукопись диссертации.

Публикации результатов исследования

По теме диссертации опубликовано 14 научных работ, в числе которых 2 статьи в журналах, входящих в Перечень РУДН, и 5 статей в журналах, цитируемых в международных базах данных (WOS, Scopus).

Структура и объем диссертации

Работа изложена на 154 страницах машинописного текста, включая 23 таблицы и 14 рисунков. Работа состоит из введения, обзора литературы, материалов и методов исследований, главы результатов собственных исследований, обсуждения результатов, выводов, практических рекомендаций. Список литературы включает 335 литературных источников, в том числе 30 отечественных и 305 зарубежных авторов.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

В исследовании приняли участие 153 русских мужчин, из них 85 инфертильных мужчин (1-я группа) с различными формами патоспермии (средний возраст 30 ± 2) и 68 (2-я группа) фертильных мужчин (средний возраст 29 ± 4). В исследуемую группу включали пациентов, репродуктивная состоятельность жен которых была подтверждена клинически.

Таблица 1.

Обследованные лица

Группа	Количество (n=153)	Возраст
Бесплодные	85	30 ± 2
Фертильные	68	29 ± 4

Частоты встречаемости аллелей и генотипов локусов *MTHFR* C677T, *MTHFR* A1298C, *MTR* A2756G, *MTRR* A66G, -262 C>T CAT, 105Ple/Val (AG) и 114Ala/Val (CT) гена *GSTP1* и G/A гена *PDE7B*, были определены в группе фертильных мужчин (n= 68) и в группе мужчин с

патоспермией (n= 70), в том числе в трёх подгруппах инфертильных мужчин: с азооспермией (n=23), астенозооспермией (n=26) и тератозооспермией (n=21).

Генотипирование по полиморфизму *G-105A* гена *SEPS1* было проведено у 68 фертильных мужчин и 85 пациентов с патоспермией, в том числе в трех подгруппах с азооспермией (n=28), астенозооспермией (n=32) и тератозооспермией (n=25). Во всех группах распределение генотипов соответствовало закону Харди-Вайнберга (p<0.05).

Таблица 2.

Клиническая характеристика обследуемых групп

Распределение мужчин по изучению полиморфизмов генов (<i>CAT</i>, <i>GSTP1</i>, <i>PDE7B</i> и <i>MTHFR</i>, <i>MTR</i> и <i>MTRR</i>)					
Группа/ Количество	Патоспермия	Астенозооспермия	Тератозооспермия	Азооспермия	Контроль
N	70 (50.72%)	26 (37.14%)	21 (30%)	23 (32.86%)	68 (49.28%)
Распределение мужчин по изучению полиморфизма <i>G-105A</i> гена <i>SEPS1</i>					
N	85 (55.55%)	32 (37.65%)	25 (29.41%)	28 (32.94%)	68 (44.45%)

Основными критериями отбора мужчин с бесплодием были отклонение показателей спермограммы; возраст от 18 до 40 лет; установленный факт бесплодия без применения контрацепции; отсутствие в анамнезе двусторонних поражений яичек; отсутствие гипоплазии яичек с двух сторон; отсутствие женского фактора бесплодия у партнерши. Критериями исключения были обструктивные формы бесплодия; эндокринные факторы бесплодия; тяжелая сопутствующая патология на момент обследования; заболевания, вызванные ИППП; генетические нарушения; аномалии в общем наборе хромосом у мужчины; мутации гена *CFTR*, делеции локуса *AZF*.

Молекулярно-генетические исследования

Выделение геномной ДНК из лейкоцитов периферической крови проводили с использованием набора «ДНК-ЭКСТРАН-1-кровь» производства ООО «Синтол» (Россия).

Коллекции образцов крови фертильных и бесплодных мужчин с патоспермией были предоставлены врачом урологом медицинского центра ООО «Ива-Меди» г. Москва (г. Троицк). Распределение полиморфизма *G-105A* гена *SEPS1* (*rs28665122*) изучали с использованием методов полимеразной цепной реакции (ПЦР) на амплификаторе «Терцик» (ДНК-Технологии) с последующей обработкой продукта амплификации эндонуклеазой *Mox 20 I* с использованием наборов реагентов «SNP экспресс» (НПФ «Evrogen», «Sibenzyme», г Москва) и анализом полиморфизма длин рестрикционных фрагментов (ПДРФ).

Определение генотипов *MTHFR C677T*, *MTHFR A1298C*, *MTR A2756G*, *MTRR A66G,-262 C>TCAT*, 105Ile/Val и 114Ala/Val гена *GSTP1* и *G/A* гена *PDE7B* проводили методом ПЦР в режиме реального времени (Real-Time-PCR). Для ПЦР использовали готовые наборы для определения соответствующих полиморфизмов (компания «Синтол»). ПЦР выполнили на амплификаторе CFX96 (Bio-Rad) с программным обеспечением CFXManager™.

Статистическая обработка данных

Статистическая обработка полученных данных проводилась с помощью критерия χ^2 для оценки соответствия распределений генотипов ожидаемым значениям при равновесии Харди-Вайнберга. Для сравнения частот генотипов и аллелей в выборках использовали OR (отношение шансов), 95% ДИ (доверительный интервал) [Wangand, Shete, 2012], и программы Statistica 6.0. Тест на соответствие распределения генотипов в выборках равновесию Харди-Вайнберга проводили с использованием

точного критерия (Exact test). Различия считали статистически значимыми при $p \leq 0.05$

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Учитывая противоречивость данных о роли полиморфизмов генов *MTHFR*, *MTR*, *MTRR*, *CAT* и *GSTP1*, а также отсутствие литературных данных о роли полиморфизмов генов *PDE7B* и *SEPS1* в развитии мужского бесплодия, в задачи нашей работы входило ассоциативное изучение распределения генотипов и аллельных вариантов по полиморфизмам вышеупомянутых генов у пациентов с астенозооспермией, тератозооспермией и азооспермией. Предполагалось выяснить, является ли носительство полиморфных вариантов этих генов факторами, лежащими в основе нарушения сперматогенеза и развития патоспермии.

1. Анализ частот встречаемости полиморфизмов генов фолатного цикла у пациентов с патоспермией

Результаты изучения распределения аллелей и генотипов по полиморфизмам *C677T MTHFR*, *A1298C*, *A2756G MTR* и *A66G MTRR* среди фертильных и бесплодных мужчин приведены в таблице 3.

Таблица 3.

Распределение аллелей и генотипов по полиморфизмам генов фолатного цикла у пациентов с патоспермией и фертильных мужчин

SNP	генотипы и аллели	Инфертильные % (n=70)	Контроль % (n=68)	χ^2	Odd ratio	95%ДИ	Значение P
MTHFR677 C/T	CC	0.44 (31)	0.49 (33)				0.86
	CT	0.40 (28)	0.38 (26)	0.307	1.30	0.29- 2.30	
	TT	0.16 (11)	0.13 (9)				
	CT+TT	0.56 (39)	0.51 (35)	0.24	1.18	0.56 – 1.85	0.61
	C	0.64	0.68				0.55
	T	0.36	0.32	0.35	1.19	0.60 –1.78	
MTHFR1298 A/C	AA	0.39 (27)	0.47 (32)				0.33
	AC	0.42 (30)	0.43 (29)	2.21	2.20	1.14 – 3.25	
	CC	0.19 (13)	0.10 (7)				
	AC+CC	0.61 (43)	0.53 (36)	1.01	1.41	0.73 – 2.09	0.31
	A	0.60	0.68				0.24

	C	0.40	0.32	1.38	1.41	0.83 – 1.99	
MTR2756 A G	AA	0.40 (28)	0.54 (37)				0.051
	AG	0.47 (33)	0.43 (29)	5.93	5.94	4.33 – 7.55	
	GG	0.13 (9)	0.03 (2)				
	AG+ GG	0.60 (42)	0.46 (31)	2.87	1.79	1.11 – 2.46	0.089
	A	0.64	0.76				0.061
G	0.36	0.24	3.42	1.78	1.16 – 2.39		
MTRR66A G	AA	0.20 (14)	0.28 (19)				0.196
	AG	0.43 (30)	0.49 (33)	3.25	1.8	0.91 – 2.71	
	GG	0.37 (26)	0.23 (16)				
	AG+ GG	0.80 (56)	0.72 (49)	1.19	1.55	0.76 – 2.34	0.27
	G	0.41	0.52				0.11
A	0.59	0.48	2.43	1.55	0.99 – 2.11		

Доступная информация об ассоциациях полиморфизмов генов *MTHFR*, *MTR* и *MTRR* с патоспермией, сообщаемая из разных популяций, является противоречивой и недостаточной, поскольку в основном оценивается полиморфизм C667T гена *MTHFR*. Наблюдаемые различия могут определяться не только этническими особенностями, но и факторами окружающей среды, например, потреблением фолиевой кислоты в популяциях, которое, в свою очередь, может влиять на метилирование ДНК и качество спермы [Kurzawski M., 2015]. Наши исследования направлены на определение ассоциации полиморфизмов *MTHFR* (*rs 1801133* и *rs1801131*), *MTR* (*rs 1805087*) и *MTRR* (*rs 1801394*) с патоспермией у этнических русских мужчин, проживающих в московском регионе.

Анализ наблюдаемых и ожидаемых частот, показал, что среди бесплодных мужчин с патоспермией распределение частот генотипов по полиморфизмам генов фолатного цикла статистически не отличалось от контрольной группы ($p > 0.05$). При сравнительном анализе распределения частот аллельных вариантов генов фолатного цикла среди пациентов с

патоспермией и в контрольной группе не было выявлено статистически значимых различий ($p>0.05$). Результаты продемонстрированы на рисунках 1 и 2.

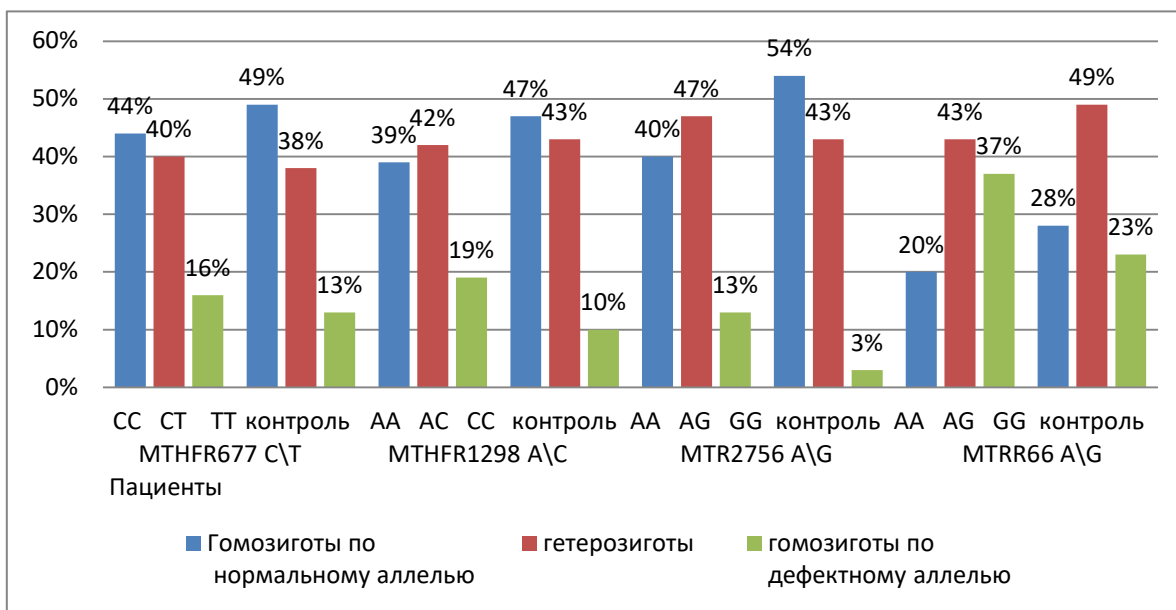


Рисунок 1. Распределение частот генотипов по полиморфизмам генов фолатного обмена среди фертильных и бесплодных мужчин

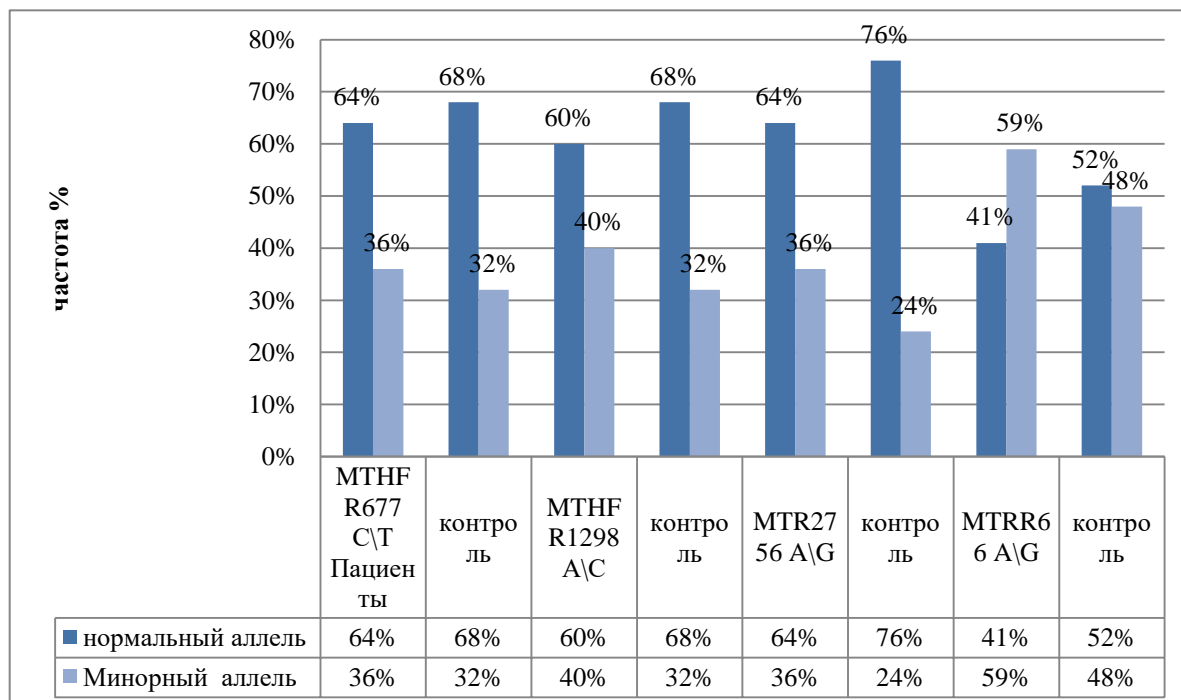


Рисунок 2. Частоты аллелей полиморфных вариантов C677T и A1298C гена MTHFR, A2756G гена MTR и A66G гена MTRR.

Для дальнейшего анализа распределения генотипов по полиморфизмам *C677T* (*rs 1801133*) и *A1298C* (*rs 1801131*) гена *MTHFR*, *A66G* гена *MTRR* (*rs 1801394*) и *A2756G* гена *MTR* (*rs 1805087*) среди бесплодных мужчин все исследуемые пациенты были распределены на подгруппы в зависимости от клинического диагноза. Данные анализа распределения частот аллелей и генотипов по изучаемым полиморфизмам в подгруппах пациентов приведены в таблице 4.

Таблица 4.

Распределение частот генотипов и аллелей по полиморфизмам генов фолатного цикла у пациентов с разными формами патоспермии

SNP	Генотип / аллель	контроль % (n=68)	Астено % (n=26)	χ^2 / P	Терато % (n=21)	χ^2 / P	Азоо % (n=23)	χ^2 / P
MTHFR 677 C/T	CC	0.49 (33)	0.46 (12)	0.08 / 0.95	0.38 (8)	1.33 / 0.51	0.48(11)	1.1 / 0.57
	CT	0.38 (26)	0.39 (10)		0.52 (11)		0.30 (7)	
	TT	0.13 (9)	0.15 (4)		0.10 (2)		0.22 (5)	
	CT+TT	0.51 (35)	0.54 (14)	0.042 / 0.83	0.62 (13)	0.70 / 0.40	0.52 (12)	0.003 / 0.95
	C	0.68	0.65	0.20 / 0.65	0.64	0.35 / 0.55	0.63	0.55 / 0.45
	T	0.32	0.35		0.36		0.37	
MTHFR 1298 A/C	AA	0.47 (32)	0.23 (6)	6.39 / 0.040*	0.48 (10)	1.33 / 0.51	0.48 (11)	0.17 / 0.91
	AC	0.43 (29)	0.50(13)		0.33 (7)		0.39 (9)	
	CC	0.10 (7)	0.27 (7)		0.19 (4)		0.13 (3)	
	AC+CC	0.53 (36)	0.77 (20)	4.49 / 0.034*	0.52 (11)	0.002 / 0.96	0.52 (12)	0.004 / 0.95
	A	0.68	0.48	8.12 / 0.004*	0.64	0.35 / 0.55	0.67	0.022 / 0.87
	C	0.32	0.52		0.36		0.33	
MTR 2756 A/G	AA	0.54 (37)	0.31 (8)	7.27 / 0.026*	0.28 (6)	5.02 / 0.081	0.61 (14)	4.54 / 0.10
	AG	0.43 (29)	0.54 (14)		0.62 (13)		0.26 (6)	
	GG	0.03 (2)	0.15 (4)		0.10 (2)		0.13 (3)	
	AG+ GG	0.46 (31)	0.69 (18)	4.21 / 0.040*	0.72 (15)	4.29 / 0.038*	0.39 (9)	0.29 / 0.58
	A	0.76	0.58	7.32 / 0.0067*	0.60	5.88 / 0.015*	0.74	0.10 / 0.74
	G	0.24	0.42		0.40		0.26	
MTRR 66 A/G	AA	0.28 (19)	0.23 (6)	3.29 / 0.19	0.14 (3)	2.47 / 0.29	0.22 (5)	5.57 / 0.74
	AG	0.49 (33)	0.35 (9)		0.48 (10)		0.48 (11)	
	GG	0.23 (16)	0.42 (11)		0.38 (8)		0.30 (7)	
	AG+ GG	0.72 (49)	0.77 (20)	0.22 / 0.63	0.86 (18)	1.60 / 0.20	0.78 (18)	0.34 / 0.55
	A	0.52	0.40	2.89 / 0.88	0.38	3.95 / 0.046*	0.46	0.72 / 0.39
	G	0.48	0.60		0.62		0.54	

Как видно из таблицы 4, частоты распределения генотипов и аллелей локусов *C677T* гена *MTHFR* и *A66G* гена *MTRR* статистически не отличаются в группе контроля и в подгруппах бесплодных мужчин с

разными формами патоспермии ($p > 0.05$), в то же время было выявлено статистически незначительное различие частот аллелей по полиморфизму *A66G* гена *MTRR* в подгруппе мужчин с тератозооспермией и группе фертильных мужчин ($p = 0.046$). Не выявлено ассоциации локусов *C677T MTHFR*, *A1298C MTHFR*, *A2756G MTR*, *A66G MTRR* с риском развития бесплодия в подгруппе мужчин с азооспермией ($p > 0.05$).

Среди пациентов с астенозооспермией распределение генотипов *A1298C MTHFR* и *A2756G MTR* статистически достоверно отличалось от контрольной группы ($\chi^2 = 6.39$, $OR = 6.22$, $P = 0.04$) и ($\chi^2 = 7.27$, $OR = 9.25$, $P = 0.026$), соответственно. Результаты продемонстрированы на рисунке 3.

Среди пациентов с астенозооспермией частота носителей минорных аллелей по полиморфизмам *A1298C* гена *MTHFR* и *A2756G* гена *MTR* (генотипы *AC+CC*) и (генотипы *AG+GG*) статистически значимо больше частоты носителей соответствующих генотипов в контрольной группе ($\chi^2 = 4.49$, $OR = 2.96$, $p = 0.034$) и ($\chi^2 = 4.21$, $OR = 2.68$, $p = 0.040$), соответственно.

Частота минорных аллелей по полиморфизмам *A1298C* гена *MTHFR* и *A2756G* гена *MTR* в исследуемой группе пациентов составляет 48% и 42%, соответственно. По результатам тестирования полиморфизмов *A1298C* гена *MTHFR* и *A2756G* гена *MTR* выявлены статистически значимые различия распределения аллелей в подгруппе мужчин с астенозооспермией и контрольной группы ($\chi^2 = 8.12$, $OR = 2.30$, $P = 0.004$) и ($\chi^2 = 7.32$, $OR = 2.29$, $P = 0.0067$).

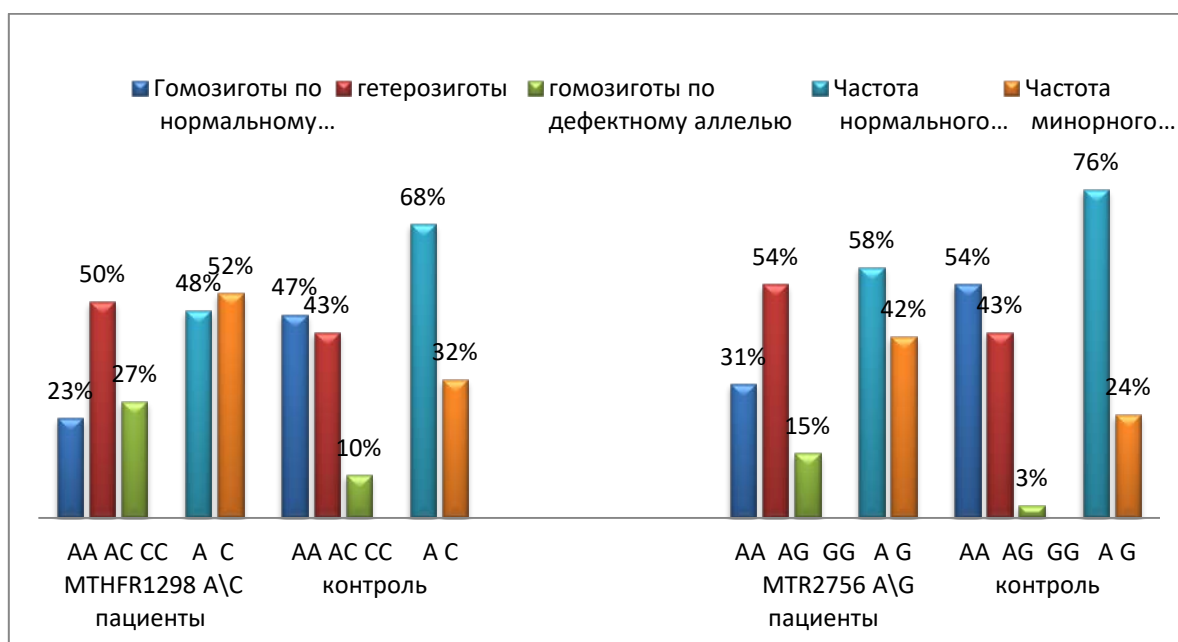


Рисунок 3. Частоты распределения генотипов и аллелей локусов *A1298C MTHFR* и *A2756GMTR* в подгруппе мужчин с астенозооспермией и фертильных мужчин.

Среди пациентов с тератозооспермией выявленное распределение частот генотипов по полиморфизму *A2756G* гена *MTR* статистически достоверно не отличается от распределения частот генотипов среди фертильных мужчин ($p > 0.05$). Однако, частоты гетерозиготных и гомозиготных носителей минорного аллеля *2756G* гена *MTR* (генотипы *AG+GG*) статистически значимо отличается от контрольной группы ($\chi^2 = 4.29, OR = 2.98, p = 0.038$). Также были выявлены статистически значимые различия частот минорного аллеля *2756G* гена *MTR* в подгруппе пациентов с тератозооспермией и в контрольной группе фертильных мужчин ($\chi^2 = 5.88, OR = 2.11, p = 0.015$).

В подгруппе больных с тератозооспермией распределение частот генотипов по полиморфизму *A66G* гена *MTRR* статистически не отличается от распределения частот генотипов в контрольной ($p = 0.74$). Однако, частоты минорного аллеля *66G* гена *MTRR* среди пациентов с тератозооспермией статистически значимо отличаются от контрольной

группы ($\chi^2=3.95$, $OR= 1.76$, $p=0.046$). Результаты продемонстрированы на рисунке 4.

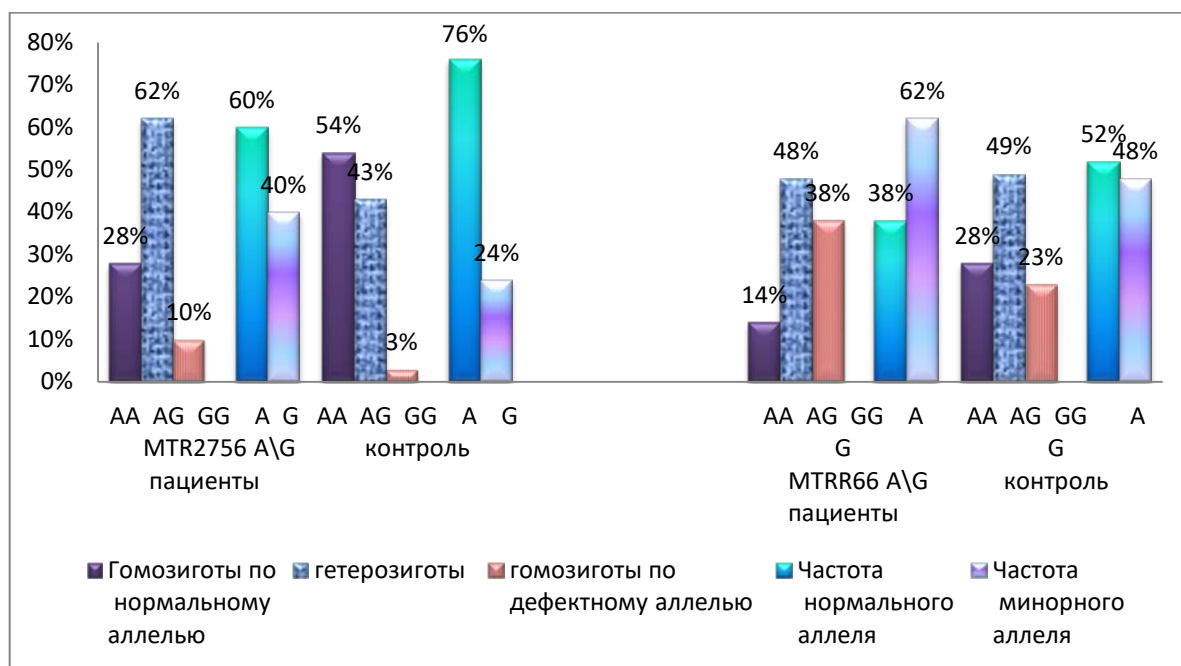


Рисунок 4. Частоты распределения генотипов и аллелей по полиморфизмам *A2756G MTR* и *A66G MTRR* в подгруппе мужчин с тератозооспермией и контрольной группы.

2. Анализ распределения полиморфизмов генов, кодирующих антиоксидантные ферменты (CAT, GSTP1), и гена фосфодиэстеразы (PDE7B) у пациентов с патоспермией

Результаты анализа распределения генотипов и аллелей по полиморфизмам *CAT* (*C262T*; *rs 1001179*), *GSTP1* (Ile/Val) (*A313G*; *rs1695*), *GSTP1* (Ala/Val) (*C341T*; *rs1138272*), *PDE7B* (G/A; *rs 7774640*) у бесплодных мужчин с патоспермией и в группе фертильных мужчин показаны в таблице 5 и на рисунках 5 и 6.

Таблица 5.

Распределение генотипов и аллелей по полиморфизмам *CAT C262T*, *GSTP1 105Ile/Val (AG)*, *114Ala/Val (CT)* и *PDE7BG/A* среди фертильных и бесплодных мужчин с патоспермией.

SN P	Генотип/ аллель	Инфертильные % (n=70)	контроль % (n=68)	χ^2	Odd ratio	95%ДИ	Значение P
CAT C/T	CC	0.5 (35)	0.69 (47)				0.044*
	CT	0.4 (28)	0.28 (19)	6.2296	4.7	3.06 – 6.33	
	TT	0.10 (7)	0.02 (2)				
	CT+TT	0.5 (35)	0.30 (21)	5.2282	2.23	1.54 – 2.93	0.022*
	C	0.70	0.83				0.030*
	T	0.30	0.17	4.700	2.09	1.41 – 2.76	
GSTP1 Ile105Val	(Ile/Ile) AA	0.43 (30)	0.49 (33)				0.344
	(Ile/Val) AG	0.40 (28)	0.43 (29)	2.131	2.2	1.10 – 3.29	
	(Val/Val)GG	0.17 (12)	0.08 (6)				
	(Ile+Val) AG+GG	0.57 (40)	0.51 (35)	0.447	1.25	0.58 – 1.92	0.50
	A	0.63	0.70				0.29
	G	0.37	0.30	1.099	1.37	0.87 – 1.96	
GSTP1 Ala114Val	(Ala/Ala) CC	0.70(49)	0.84 (57)				0.09
	(Ala/Val) CT	0.27 (19)	0.16 (11)	4.70	-	-	
	(Val/Val) TT	0.03 (2)	0 (0)				
	(Ala+Val) CT+TT	0.30 (21)	0.16 (11)	3.70	2.22	1.39 – 3.04	0.054
	C	0.84	0.92				0.081
	T	0.16	0.08	3.03	2.19	1.29 – 3.08	
PDE7BG/A	GG	0.39 (27)	0.46 (31)				0.483
	GA	0.42 (30)	0.43 (29)	1.45	1.86	0.84 – 2.88	
	AA	0.19 (13)	0.11 (8)				
	GA+AA	0.61 (43)	0.54 (37)	0.69	1.33	0.65 – 2.01	0.40
	G	0.60	0.67				0.303
	A	0.40	0.33	1.0570	1.35	0.77 - 1.93	

Среди исследуемых мужчин с патоспермией частоты распределения генотипов по полиморфизму *C262T CAT* статистически значимо отличалось от контрольной группы ($\chi^2=6.22, OR=4.7, p=0.04$). Гомозиготный генотип *262CC* обнаружен у 50% пациентов; гетерозиготный генотип *262CT* зарегистрирован у 40%; у 10% определен гомозиготный генотип *262TT* гена *CAT*. Частота носителей генотипов

(СТ+ТТ) в группе мужчин с патоспермией встречается достоверно чаще по сравнению с контрольной группой фертильных мужчин ($\chi^2=5.22$, OR= 2.23, $p=0.02$). Выявлено статистически значимое различие распределения частот минорного аллеля 262T гена *CAT* среди пациентов с патоспермией и в контрольной группе ($\chi^2=4.70$, OR= 2.09, $p=0.03$).

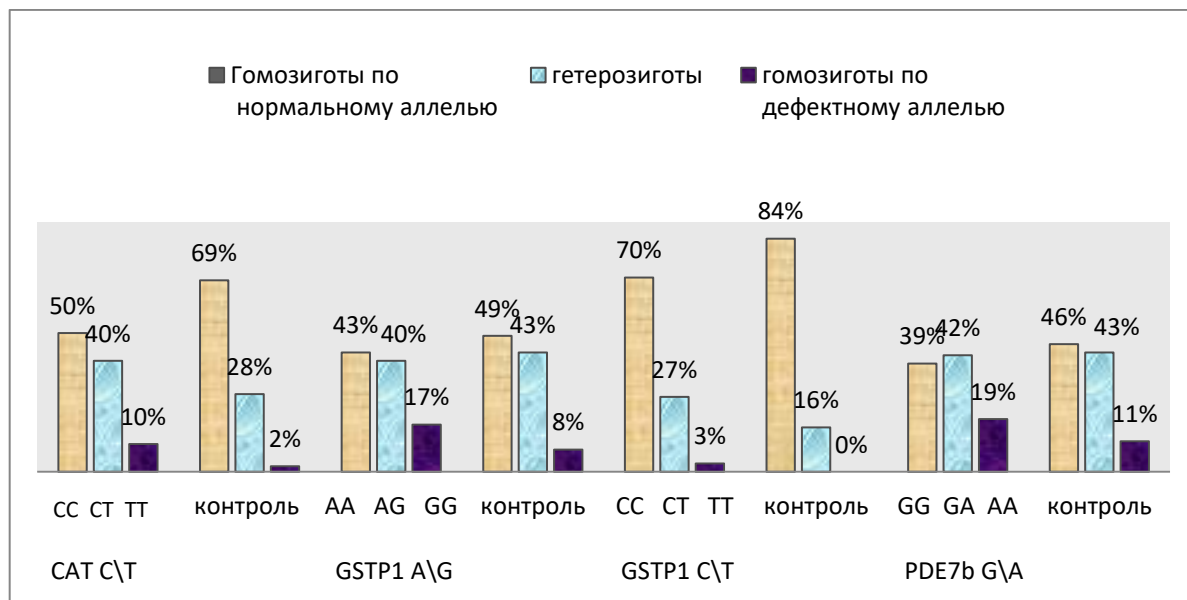


Рисунок 5. Распределение частот генотипов по полиморфизмам C\T *CAT*, A\G *GSTP1*, C\T *GSTP1u* G\A *PDE7b* у пациентов с патоспермией и фертильных мужчин.

Распределение генотипов (*GSTP1* 105Ile/Val (AG), 114Ala/Val (CT) и *PDE7b*G\A) в группе пациентов с патоспермией статистически не отличалось от контрольной группы ($p>0.05$). Частоты гомозиготных генотипов *GSTP1* 105Ile/Ile(AA), *GSTP1* 114Ala/Ala (CC) и *PDE7b* (GG) составляют 43%, 70% и 39% , соответственно. Гетерозиготные генотипы *GSTP1* 105Ile/Val (AG), *GSTP1* 114Ala/Val(CT) и *PDE7b* (GA) составляют 40%, 27% и 42%, соответственно. Гомозиготы по минорному аллелю *GSTP1* 105Val/Val (GG), *GSTP1* 114Val/Val (TT) и *PDE7b* (AA) составили 17%, 3% и 19% , соответственно.

Сравнительный анализ распределения частот аллельных вариантов 105Val (G) *GSTP1*, 114Val (T) *GSTP1* и аллеля G гена *PDE7b* среди пациентов с патоспермией и в контрольной группы доноров не выявил

статистически значимых различий ($p>0.05$). Результаты приведены на рисунке 6.

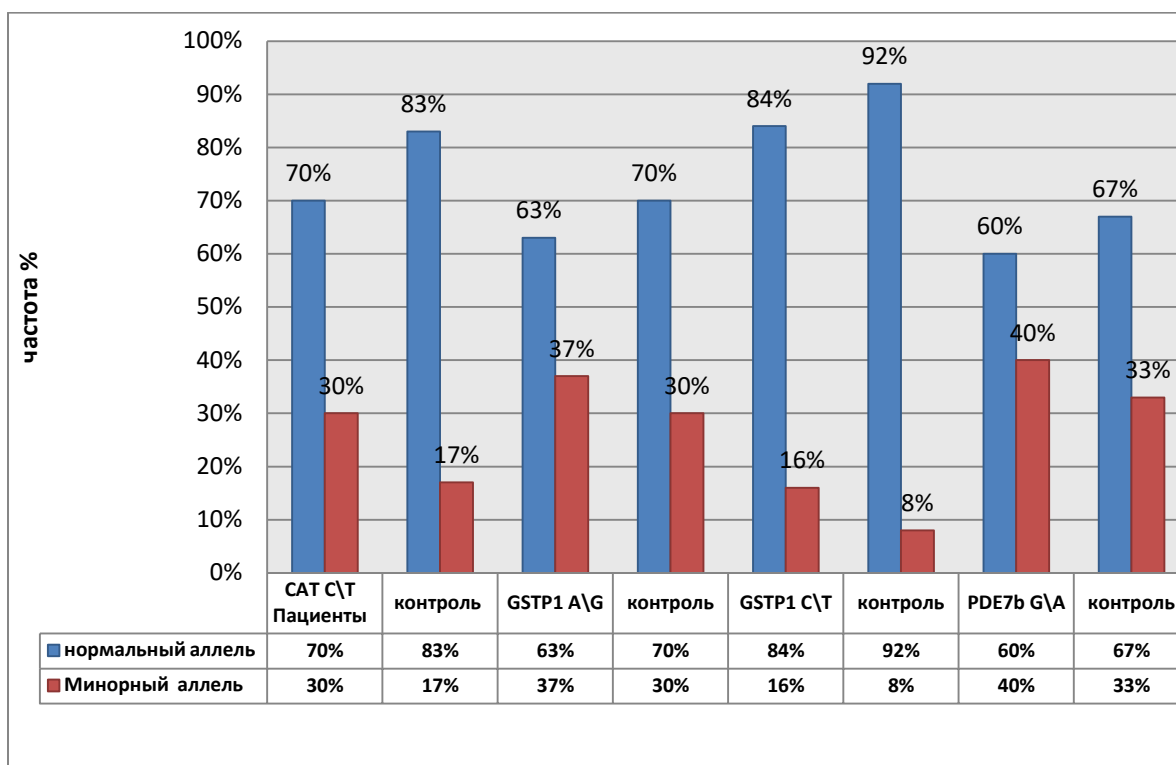


Рисунок 6. Распределение аллельных вариантов генов антиоксидантной защиты *CAT* и *GSTP1* и фосфодиэстеразы *PDE7B* в группах пациентов с патоспермией и фертильных мужчин.

Для дальнейшего анализа распределения генотипов генов *C262TCAT*, 105Ile/Val (AG) *GSTP1*, 114Ala/Val(CT) *GSTP1* и G\A *PDE7b* среди больных все исследуемые пациенты были распределены на подгруппы в зависимости от клинического диагноза. Частоты встречаемости генотипов и аллельных вариантов генов *CAT*, *GSTP1* и *PDE7b* в подгруппах приведены в таблице 6.

При анализе наблюдаемых и ожидаемых частот, показано, что среди исследуемых пациентов с азооспермией, астенозооспермией и тератозооспермией распределения генотипов и аллельных вариантов гена *PDE7B* статистически не отличается от контрольной группы ($p>0.05$).

В подгруппах пациентов с астенозооспермией и тератозооспермией частоты распределения генотипов по полиморфизму *CAT* (*rs 1001179*) статистически значимо отличаются от распределения частот соответствующих генотипов в группе фертильных мужчин ($p=0.033$ и

$p=0.031$, соответственно). Частота носителей минорного аллеля (генотипы СТ+ТТ) в исследуемых подгруппах статистически значимо больше частоты в контрольной группе ($p=0.039$ и $p=0.010$, соответственно).

Таблица 6.

Частоты встречаемости генотипов и аллельных вариантов генов *CAT*, *GSTP1* и *PDE7b* в подгруппах бесплодных мужчин с разными формами патоспермии

SNP	Генотип / подгруппы	контроль % (n=70)	Астено % (n=26)	χ^2 / P	Терато % (n=21)	χ^2 / P	Азоо % (n=23)	χ^2 / P
CAT C/T	CC	0.69 (47)	0.46 (12)		0.38 (8)		0.65 (15)	0.17 /
	CT	0.28 (19)	0.38 (10)	6.81 /	0.52 (11)	6.88 /	0.31 (7)	0.91
	TT	0.02 (2)	0.15 (4)	0.033*	0.10 (2)	0.031*	0.04 (1)	
	СТ+ТТ	0.30 (21)	0.53 (14)	4.24 / 0.039*	0.62 (13)	6.54 / 0.010*	0.35 (8)	0.12 / 0.72
	АллельС	0.83	0.65	8.41 /	0.64	9.26 /	0.80	0.29 /
	АллельТ	0.17	0.35	0.0037*	0.36	0.002*	0.20	0.58
GSTP1 Ile105Val	(Ile/Ile) AA	0.49 (33)	0.54 (14)		0.19 (4)		0.52 (12)	0.16 /
	(Ile/Val) AG	0.43 (29)	0.31 (8)	1.54 /	0.57 (12)	7.00 /	0.35 (8)	0.73
	(Val/Val) GG	0.08 (6)	0.15 (4)	0.46	0.24 (5)	0.03*	0.13 (3)	
	(Ile+Val) AG+GG	0.51 (35)	0.46 (12)	0.21 /	0.81 (17)	5.74 / 0.016*	0.48 (11)	0.09 / 0.76
	Аллель А	0.70	0.69	0.023 /	0.48	10.00 /	0.70	0.023 /
GSTP1 Ala114Val	Аллель G	0.30	0.31	0.87	0.52	0.0015*	0.30	0.84
	(Ala/Ala) CC	0.84 (57)	0.58 (15)	8.47	0.62 (13)	6.55	0.91 (21)	
	(Ala/Val) CT	0.16 (11)	0.38 (10)	0.014	0.33 (7)	0.03	0.09 (2)	0.78 /
	(Val/Val) TT	0 (0)	0.04 (1)	*	0.05 (1)	7*	0.0 (0)	0.37
	(Ala+Val) CT+TT	0.16 (11)	0.42(11)	7.16 / 0.007*	0.38 (8)	4.6/ 0.032	0.09 (2)	0.78/ 0.37
PDE7b	Аллель С	0.92	0.77	8.58 /	0.79	6.81	0.96	1.41/
	Аллель Т	0.08	0.23	0.003*	0.21	0.009*	0.04	0.23
	GG	0.46 (31)	0.35 (9)	0.95 /	0.52 (11)	1.59 /	0.30 (7)	2.24 /
	GA	0.43 (29)	0.50 (13)	0.62	0.29 (6)	0.45	0.49 (11)	0.32
	AA	0.11 (8)	0.15 (4)		0.19 (4)		0.21 (5)	
	GA+AA	0.54 (37)	0.65 (17)	0.926 /	0.48 (10)	0.926 /	0.70 (16)	1.622/ 0.20
	АллельG	0.67	0.59	1.37 /	0.66	0.02 /	0.54	3.53 /
	АллельА	0.33	0.41	0.24	0.34	0.88	0.46	0.06

При сравнительном анализе распределения частот аллельных вариантов С262Тгена *CAT* среди пациентов с астенозооспермией и тератозооспермией и в контрольной группе мужчин выявлены

статистически значимые различия ($\chi^2=8.41$, OR= 2.62, $p=0.0037$) и ($\chi^2=9.26$, OR= 2.74, $p=0.002$), соответственно. На основе полученных результатов установлена ассоциация полиморфизма C262T гена *CAT* (*rs 1001179*) с мужским бесплодием у пациентов с астенозооспермией и тератозооспермией ($p<0.05$).

В подгруппе больных с азооспермией выявленное распределение генотипов по полиморфизму C262T *CAT* статистически не отличается от контрольной группы ($p=0.91$). Среди пациентов с азооспермией и в группе фертильных частоты минорного аллеля 262T гена *CAT* составляет 20% и 17%, соответственно ($p>0.05$.)

Распределения генотипов и аллельных вариантов по полиморфизму 105Ple/Val гена *GSTP1*(A313G; *rs1695*) в подгруппе пациентов с астенозооспермией и азооспермией статистически значимо не отличалось от контрольной группы ($p>0.05$).

Значимые различия наблюдались при изучении ассоциации генотипов и аллельных вариантов по полиморфизму 105Ple/Val гена *GSTP1*(A313G; *rs1695*) в подгруппе пациентов с тератозооспермией ($\chi^2=7.001$, $p=0.03$). Результаты анализа распределения частот генов и генотипов в подгруппе мужчин с тератозооспермией и в группе фертильных мужчин представлены на рисунке 7.

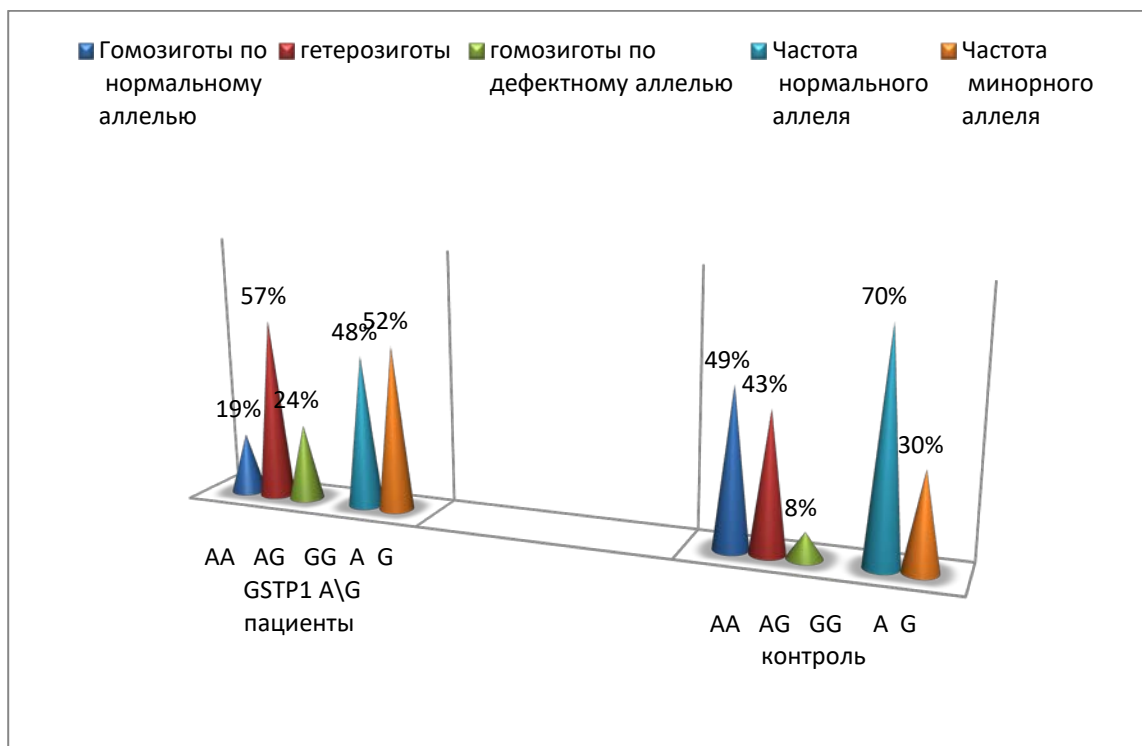


Рис. 7. Распределение частот аллельных вариантов и генотипов полиморфизма 105Ple/Val (AG) гена *GSTP1* (*rs1695*) среди бесплодных мужчин с тератозооспермией и в группе фертильных мужчин.

Частоты генотипов по полиморфизму Ala114Val (C\T) *GSTP1* (*rs1138272*) в подгруппе мужчин с астенозооспермией статистически достоверно отличаются от частот соответствующих генотипов в группе контроля ($\chi^2=8.47$, $p=0.014$). Распределение частот минорного аллеля 114Val (T) гена *GSTP1* среди пациентов с астенозооспермией и в группе контроля статистически значимо различаются ($\chi^2=8.58$, $p=0.003$). В подгруппе мужчин с тератозооспермией распределение генотипов Ala114Val (C\T) *GSTP1* *rs1138272* статистически достоверно отличается от группы контроля ($\chi^2=6.55$, $p=0.037$). Частоты минорного аллеля 114Val (T) гена *GSTP1* среди мужчин с тератозооспермией и в группе контроля имеют статистически значимые различия ($\chi^2=6.81$, $OR= 3.05$, $p=0.009$).

Среди мужчин с азооспермией и контрольной группы не выявлены статистически значимые различия в распределении генотипов и аллелей по полиморфизму Ala114Val (C\T) гена *GSTP1* ($\chi^2=0.78$, $p=0.37$; $\chi^2=1.41$, $p=0.23$). Результаты анализа распределения частот генов и генотипов в

подгруппах мужчин с разными формами патоспермии и в группе фертильных мужчин представлены на рисунке 8.

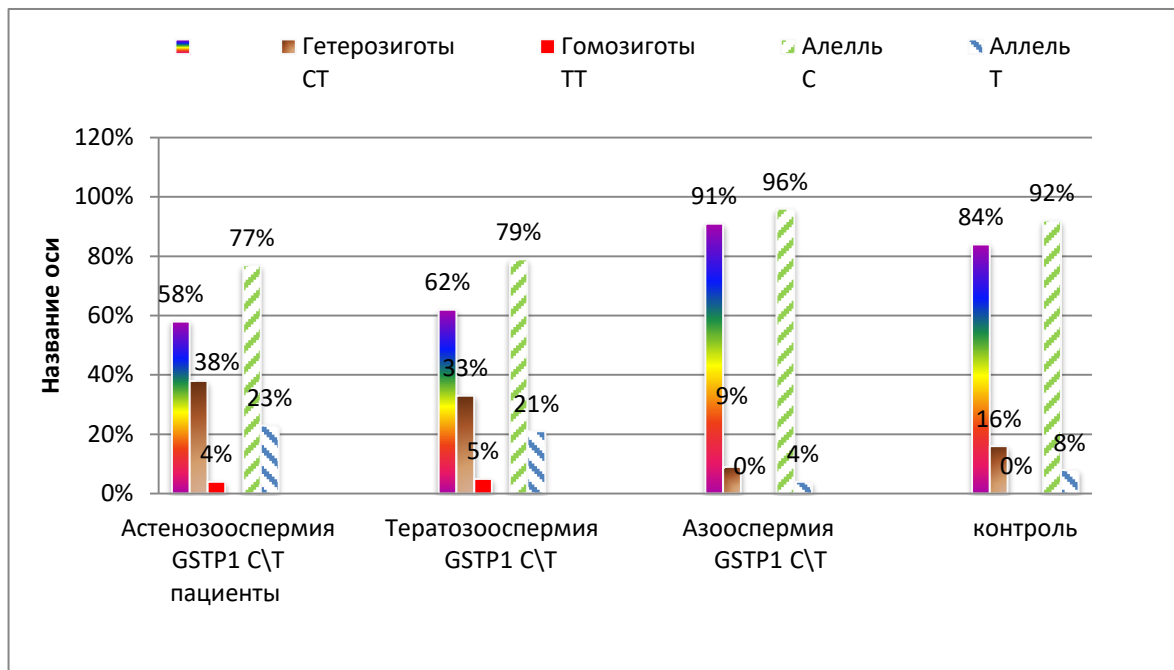


Рис.8. Распределение частот генов и генотипов по полиморфизму Ala114Val (C\T) *GSTP1(rs1138272)* в подгруппах мужчин с разными формами патоспермии и фертильных мужчин.

3. Анализ и оценка достоверности различий аллельного распределения полиморфизма G-105A гена *SEPS1 (rs28665122)* у бесплодных мужчин с патоспермией

Селенопротеин S1 (*SEPS1*) относится к группе мембранных протеинов, которые контролируют стрессовый ответ на активацию воспалительного каскада в эндоплазматическом ретикулуме и защищает функциональную целостность эндоплазматической сети от разрушающих воздействий оксидативного стресса [Du X.A., *et. al.*, 2015; Sun H.Y., *et.al.*,2016]. В работах зарубежных авторов была выявлена корреляция полиморфизма G-105A гена *SEPS1(rs28665122)* с развитием патологических состояний воспалительного генеза, связанных с риском возникновения преждевременных родов у женщин [Yan Wang I., *et.al.*,

2013], а также риском аутоиммунных и онкологических заболеваний в некоторых европейских и азиатских популяциях [Santos L.R., 2014].

Поскольку изучение ассоциации полиморфизма G-105A гена *SEPS1(rs28665122)* с мужским бесплодием не проводилось ни в Российской Федерации, ни в других популяциях, весьма актуальным представляется изучение ассоциации данного полиморфизма с развитием патоспермии среди русских мужчин, проживающих в московском регионе.

Таблица 7.

Частоты распределение генотипов по полиморфизму *G-105A SEPS1* у бесплодных пациентов с патоспермией и контрольной группы

<i>SEPS1</i>			χ^2	Oddratio	95%ДИ	P
Генотип SEPS1 G\A	Инфертильные мужчины N=85 (%)	Фертильные мужчины N=68 (%)				
GG	38 (44.71)	49 (72.05)	11.54	3.05	0.28 – 5.16	P =0.003
GA	45 (52.94)	18 (26.47)				
AA	2 (2.35)	1 (1.4)				
Носители (генотипы GA+AA)	47 (55.29)	19 (27.94)	11.52	3.18	2.50 – 3.87	P=0.0007
Частота аллеля G	71	85	5.71	2.31	1.61 – 3.01	P = 0.016
Частота аллеля A	29	15				

Мужчины группы контроля с доказанной фертильностью имеют гомозиготный генотип *-105GG* в 72.05% случаев, в то время как у мужчин с бесплодием данный генотип наблюдается в 44.71% случаев. В группе фертильных мужчин гетерозиготный генотип *-105GA* встречается с меньшей частотой, чем у мужчин с бесплодием - 26.47% и 52.94%, соответственно. Гомозиготный генотип *-105AA* в группе пациентов встречается с частотой 2.35%; в контрольной группе -1.4%.

При анализе распределения частот генотипов по полиморфизму *SEPS1 rs28665122* у мужчин с патоспермией и фертильных мужчин

выявлены статистически значимые различия ($\chi^2=11,54$; OR= 3.05; $p=0,003$). В группе мужчин с патоспермией носители минорного аллеля (генотипы GA+AA) встречаются почти в 2 раза чаще (55.29%), чем среди фертильных мужчин (27.94%). Наличие данного генотипа, вероятно ассоциировано с повышенным риском развития патоспермии и репродуктивных нарушений у мужчин московского региона ($\chi^2=11,52$; OR= 3.18; $p=0,0007$). Результаты представлены в таблице 7 и на рисунке 9.

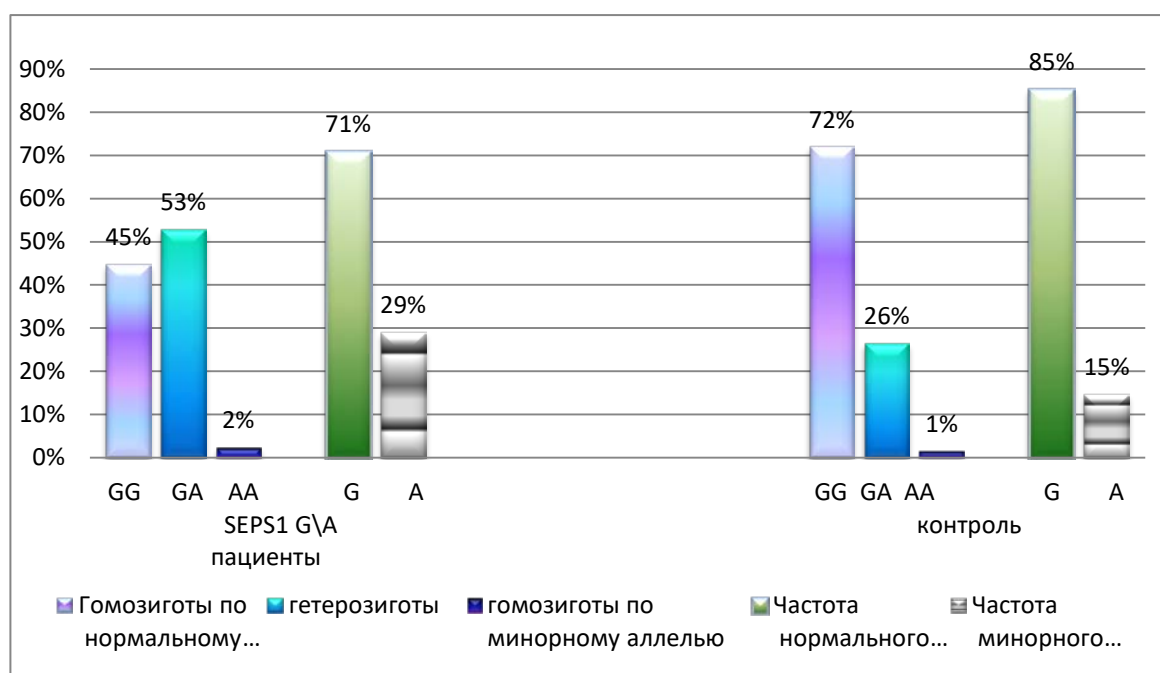


Рис.9. Частоты аллелей и генотипов полиморфизма G-105A гена *SEPS 1* у бесплодных мужчин с патоспермией и фертильных мужчин.

Частоты аллеля 105G *SEPS1* в исследуемой группе пациентов и в контрольной группе фертильных мужчин составили 71% и 85%, соответственно, частоты минорного аллеля 105A *SEPS1* в исследуемой группе пациентов и в контрольной группе составили 29% и 15%, соответственно. При сравнительном анализе распределения частот аллельных вариантов G-105A гена *SEPS1* среди пациентов с патоспермией и в контрольной группе фертильных мужчин было выявлено статистически значимое различие ($\chi^2=5,71$; OR= 2.31; $p=0,016$).

Для более детального изучения распределения частот аллелей и генотипов гена *SEPS1 G-105A* среди бесплодных мужчин с патоспермией все исследуемые пациенты были распределены на группы в зависимости от клинического диагноза. Данные анализа распределения полиморфизма *G-105A* гена *SEPS1 (rs28665122)* в подгруппах пациентов в зависимости от клинического диагноза приведены в таблице 8.

Таблица 8.

Частоты распределения полиморфных вариантов локуса G-105A SEPS1 в подгруппах бесплодных пациентов и контрольной группы

SNP	Генотип/ аллель	Инфертильные %(n=85)	контроль % (n=68)	χ^2	Odd ratio	95%ДИ	Значение P
Астенозооспермия N= 32	GG	0.38 (12)	0.72 (49)				
	GA	0.59 (19)	0.27 (18)	10.92	4.08	1.24 – 6.92	0.0042
	AA	0.03 (1)	0.01 (1)				
	GA+AA	0.62 (20)	0.28 (19)	10.92	2.29	3.40 – 5.18	0.00095
	G	0.67	0.85				
	A	0.33	0.15	8.88	2.79	2.10 – 3.48	0.0028
Терагозооспермия N= 25	GG	0.40 (10)	0.72 (49)				
	GA	0.56 (14)	0.27 (18)	8.13	4.90	2.04 – 7.75	0.017
	AA	0.04 (1)	0.01 (1)				
	GA+AA	0.60 (15)	0.28 (19)	8.10	3.86	2.90 – 4.82	0.0044
	G	0.68	0.85				
	A	0.32	0.15	8.03	2.66	1.79 – 3.35	0.0045
Азооспермия N= 28	GG	0.57 (16)	0.72 (49)				
	GA	0.43 (12)	0.27 (18)	2.76	-	-	0.25
	AA	0 (0)	0.01 (1)				
	GA+AA	0.43 (12)	0.28 (19)	2.01	1.93	1.01 – 2.85	0.15
	G	0.79	0.85				
	A	0.21	0.15	1.50	1	0.77 – 2.23	0.27

При сравнении распределения частот генотипов по полиморфизму G-105A гена *SEPS1 (rs28665122)* среди пациентов с астенозооспермией и

фертильных мужчин было выявлено достоверное различие ($\chi^2=10,92$; OR= 4.08; $p=0,0042$). Гомозиготный генотип 105GG в группе больных выявлен в 38% случаев; в группе фертильных мужчин в 72% случаев; гетерозиготный генотип 105GA в группе пациентов и в группе фертильных мужчин зарегистрирован в 59% и 27% случаев, соответственно. Гомозиготный генотип 105AA обнаружен в 3% и 1% случаев, соответственно. Частоты носителей минорного аллеля (генотипы GA+AA) в исследуемой подгруппе пациентов статистически значимо отличается от соответствующей частоты в контрольной группе ($\chi^2=10,92$; OR= 2.29; $p=0,00095$).

При сравнительном анализе распределения частоты минорного аллеля 105A гена *SEPS1* среди пациентов с астенозооспермией и в контрольной группе выявлено статистически значимое различие ($\chi^2=8,88$; OR= 2.79; $p=0,0028$).

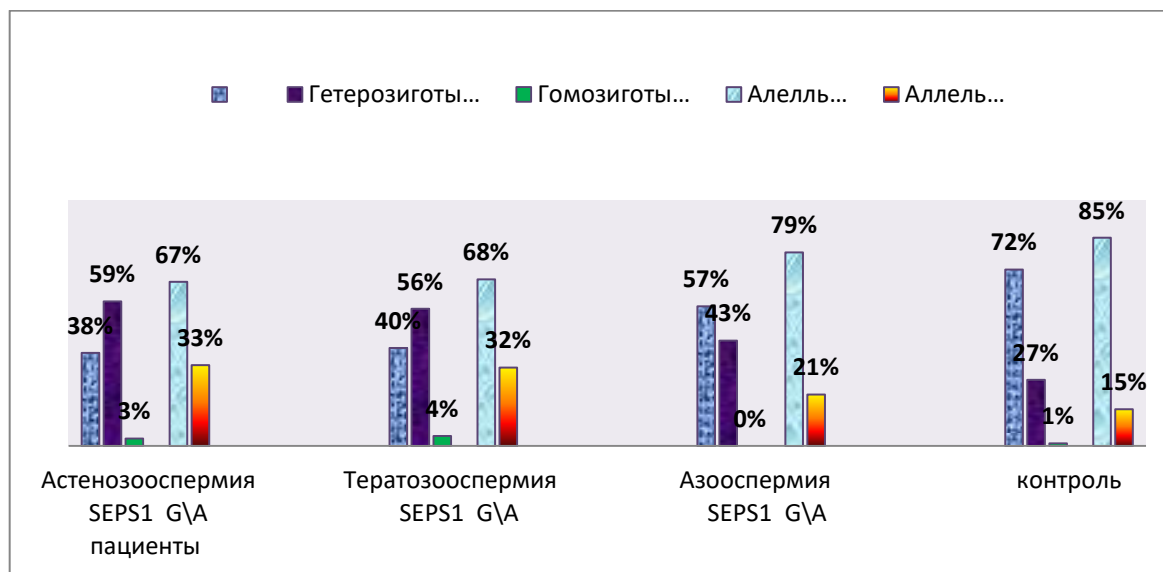


Рисунок 10. Частоты распределения генотипов и аллельных вариантов G/A *SEPS1* в группе фертильных и в подгруппах мужчин с разными формами патоспермии.

В подгруппе мужчин с тератозооспермией гомозиготы 105GG *SEPS1* составили 40% , гетерозиготы 105GA *SEPS1* составили 56%; гомозиготы по минорному аллелю 105AA *SEPS1* составили 4%, что статистически достоверно отличалась от распределения

соответствующих генотипов в контрольной группе ($\chi^2=8,13$; OR= 4.90; $p=0,017$). Носители минорного аллеля -105A (генотипы GA+AA) в подгруппе мужчин с тератозооспермией зарегистрированы у 60% мужчин, в группе фертильных мужчин –28% ($\chi^2=8,10$; OR= 3.86; $p=0,0044$). Анализ распределения частоты минорного аллеля -105A гена *SEPS1* среди пациентов с тератозооспермией и в контрольной группе выявил статистически достоверные различия ($\chi^2=8,03$; OR= 2.66; $p=0,0045$).

Анализ частот встречаемости полиморфных вариантов *SEPS1* (*rs28665122*) не выявил статистически значимые различия частот генотипов и генетических вариантов полиморфного локуса G-105A *SEPS1* в группе обследуемых мужчин с азооспермией и фертильных мужчин ($p>0.05$). Результаты исследований ассоциации полиморфного локуса *SEPS1* (*rs28665122*) разными формами патоспермии представлены на рисунке 10.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В рамках диссертационного исследования предполагалось изучить распределение полиморфизмов *C677T* (*rs 1801133*) и *A1298C* (*rs 1801131*) гена *MTHFR*, *A66G* гена *MTRR* (*rs 1801394*), *A2756G* гена *MTR* (*rs 1805087*), *-262 C>T* гена *CAT* (*rs 1001179*) *GSTP1* (Ile/Val) (*A313G*; *rs1695*) и *GSTP1* (Ala/Val) (*C341T*; *rs1138272*), *G/A* гена *PDE7B* (*rs 7774640*) и *G-105A* гена *SEPS1* (*rs28665122*) и выявить возможную ассоциацию этих полиморфизмов с риском развития патоспермии у русских мужчин, проживающих в московском регионе. На основе полученных результатов можно сделать следующие выводы:

1. Выявлена ассоциативная связь аллеля 1298C гена *MTHFR* *rs 1801131* с риском астенозооспермии и аллеля 2756G гена *MTR* *rs 1805087* с риском астенозооспермии и тератозооспермии.

2. Аллель *-262T* гена каталазы *CAT (rs 1001179)* может рассматриваться как генетический фактор риска развития патоспермии у мужчин с бесплодием. Среди мужчин с патоспермией и в подгруппах с астенозооспермией и тератозооспермией распределения генотипов гена *CAT rs 1001179* статистически значимо отличается от контрольной группы фертильных мужчин.

3. Ассоциация полиморфизмов *C677T* гена *MTHFR rs 1801133* и *A66G* гена *MTRR rs 1801394* и полиморфизма *G/A* гена *PDE7B rs 7774640* с риском развитием патоспермии среди русских мужчин московского региона не выявлена.

4. Полиморфизм гена *GSTP1 (Ile/Val) (A>G, rs1695)* ассоциирован с риском тератозооспермии, полиморфизм *GSTP1 (Ala/Val) (C>T, rs1138272)* ассоциирован с развитием тератозооспермии и астенозооспермии у мужчин с бесплодием.

5. Носительство аллеля *-105A* гена *SEPS1* ассоциируется с развитием патоспермии и, как следствие, идиопатического бесплодия среди мужчин Московского региона. Полиморфизм *G-105A* гена *SEPS1 rs28665122* оказывает влияние на развитие астенозооспермии и тератозооспермии у мужчин с бесплодием.

6. Установлено, что полиморфизмы *A1298C* гена *MTHFR rs 1801131*, *A2756G* гена *MTR rs 1805087*, *-C262T* гена каталазы *CAT*, *(C>T, rs1138272)* гена *GSTP1(Ala/Val) (C>T, rs1138272)* и *G-105A* гена *SEPS1 (rs28665122)* ассоциированы с риском тератозооспермии и астенозооспермии у русских мужчин, проживающих в московском регионе. Ни один из изучаемых полиморфизмов генов фолатного обмена, антиоксидантной защиты и селенопротеина *SI* не ассоциирован с риском азооспермии у бесплодных русских мужчин данного региона.

ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

Полученные результаты изучения полиморфизмов генов селенопротеина и фолатного цикла у мужчин с патоспермией возможно учитывать при планировании беременности с целью генетического тестирования пациентов и принятия решения о выборе соответствующей тактики лечения. Для мужчин носителей полиморфных вариантов генов фолатного обмена *1298C* гена *MTHFR* и *2756G* гена *MTRR* рекомендовано назначение фолата и витамина В12 для компенсации пониженной активности ферментов метаболизма фолатного обмена с целью протективного эффекта риска патоспермии.

ПЕРСПЕКТИВЫ ДАЛЬНЕЙШЕЙ РАЗРАБОТКИ ТЕМЫ

Выполненное исследование демонстрирует возможность изучения аддитивного эффекта полиморфизмов генов *MTHFR*, *MTRR*, *CAT*, *GSTP1* и гена *SEPS1* в развитии идиопатического бесплодия мужчин для заключения о репродуктивном потенциале пациента и выбора соответствующей тактики лечения. Для изучения других генетических факторов, влияющих на развитие идиопатического мужского бесплодия, необходимы комплексные многоцентровые исследования ассоциаций аллельных полиморфизмов многих генов, способных объяснить весь многоступенчатый характер нарушения процессов сперматогенеза. Несомненно, идиопатическое бесплодие у мужчин являются результатом целой серии генетических изменений, и дальнейшие исследования должны выявить ключевые события для объяснения клинических особенностей этого процесса.

В настоящее время перспективами дальнейшей разработки темы является дальнейшее изучение особенностей влияния полиморфизма G-105A гена *SEPS1* на развитие патоспермии на большем количестве пациентов.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1. Мяндина Г.И., Альхеджой Хасан, Тарасенко Е.В., Кульченко Н.Г. Влияние полиморфизма G-105A гена SEPS1 на репродуктивную функцию мужчин. *Технологии живых систем*. 2017;14 (6): 31 – 34.
2. Кульченко Н.Г., Мяндина Г.И., Хасан Альхеджой. Полиморфизм гена SEPS1 G-105A как предиктор мужского бесплодия. Сочи. Дагомыс. 2017. С.41 – 41.
3. Мяндина Г.И., Альхеджой Хасан, Тарасенко Е.В., Кульченко Н.Г. Полиморфизм гена SEPS1 G-105A как предиктор мужского бесплодия. Материалы XVII Всероссийского симпозиума "Эколого-физиологические проблемы адаптации". М. РУДН. 2017 г. С. 160-161.
4. Alhejoj H., Myandina G., Azova M., Tarasenko E., Zheludova E., Kulchenko N., Eremina I., Kostin A., Neborak E., Syatkin S. Selenoprotein S1 (SEPS1) – 105G>A polymorphism and male infertility// *FEBS Open Bio*. 2018; .8(Suppl. S1): 260 – 260.
5. Альхеджой Х., Тарасенко Е.В. Особенности диагностики генетического фактора мужского бесплодия. *Вестник "Биомедицина и социология"*. 2018;3 (4): 20 – 22.
6. Кульченко Н.Г., Мяндина Г.И., Альхеджой Х. Генетическое ассоциативное исследование роли полиморфизма G-105A гена *SEPS1* при мужском бесплодии. *Исследования и практика в медицине*. 2018; 5 (2): 65 – 71.
7. Кульченко Н.Г., Мяндина Г.И., Альхеджой Х. Клинический опыт выявления полиморфизма гена *SEPS1* при мужском бесплодии. Трудный пациент. (Гастроэнтерология. Ревматология. Неврология. Урология). 2018; 16 (6): .65 – 66.
8. Мяндина Г.И., Кульченко Н.Г., Альхеджой Х. Полиморфизм G-105A гена SEPS1 и мужское бесплодие.

Медицинский вестник Северного Кавказа. 2018;13(3): 488 – 490.
(Scopus)

9. Мяндина Г.И., Альхеджой Х.М.Х., Кульченко Н.Г. Ассоциация полиморфизмов -262 С>Т гена *CAT* и G/A гена *PDE7B* с риском мужского бесплодия. Современная наука: актуальные проблемы теории и практики. Серия "Естественные и технические науки". 2019; (3): 37 – 41.

10. Myandina G., Kulchenko N., Hasan Alhejoj, Tarasenko E. Disturbances of folate metabolism in men with infertility. *Archiv Euromedica*. 2019; 9 (2): 105 – 107. (WOS)

11. Myandina G.I., Kulchenko N.G., Alhejoj Hasan. The frequency of polymorphism -262 C>T *CAT* gene of infertile men in the Moscow region. *Медицинский вестник Северного Кавказа*. 2019;14(3): 478 - 481 (Scopus)

12. Myandina G.I., Kulchenko N.G., Alhejoj H.M. Polymorphism of *GSTP1* gene and pathospermia as a male infertility factors in Moscow. Материалы XVIII Всероссийского симпозиума с международным участием "Эколого-физиологические проблемы адаптации". М.: РУДН. 2019 г. С. 271 – 272.

13. Galina I. Myandina, Alhejoj Hasan, Madina M. Azova, Ekaterina V. Tarasenko, Nina G. Kulchenko. Influence of *GSTP1* gene polymorphism on decreased semen quality. *Russian Open Medical Journal* 2019; 1 (4):1 – 4. (Scopus)

14. Н. Г. Кульченко, Г. И. Мяндина, Х. Альхеджой, Е. В. Тарасенко. Влияние полиморфизмов С677Т и А1298С гена *MTHFR* на репродуктивную функцию мужчин. *Урология*. 2020; (2): 59 - 63. (Scopus)

Аннотация
диссертации Альхеджой Хасан Мохаммад Хасан
«Генетические аспекты нарушения репродуктивной функции у
мужчин с патоспермией»

Нарушения параметров спермограммы, вероятно, определяются полиморфизмами многих генов, участвующих в сперматогенезе. Диссертационное исследование посвящено изучению ассоциации полиморфизмов генов фолатного обмена, антиоксидантой защиты, фосфодиэстеразы *PDE7B* и селенопротеина S1 с развитием патоспермии среди русских мужчин с нарушением фертильной функции. Выявлена ассоциация ранее неизученных в этом аспекте полиморфизмов (*SEPS1*rs28665122) и (*CAT* rs1001179) с риском развития патоспермии у русских мужчин с нарушением фертильной функции. Выявленная ассоциативная связь аллеля 1298C гена *MTHFR* rs 1801131; 2756G гена *MTR* rs 1805087,-262T гена каталазы *CAT*, (C>T, rs1138272) гена *GSTP1*(Ala/Val) (C>T, rs1138272) и G-105A гена *SEPS1* (rs28665122) с риском астенозооспермии и тератозооспермии позволяет рекомендовать проведение генетического тестирования для пациентов с патоспермией при планировании беременности с целью выбора соответствующей тактики лечения.

Данные о частотах аллелей и генотипов по полиморфным локусам изучаемых генов среди русских мужчин московского региона, полученные в настоящем исследовании, вносят вклад в изучение генетических особенностей жителей данного региона.

Summary
of the dissertation “Genetic aspects of disturbance of fertility in men with
pathospermia” by Alhejoj Hasan Mohammad Hasan

The purpose of the research is to identify a possible association of the polymorphisms of folate metabolism, oxidative stress, selenoprotein S1 genes with risk of pathospermia in Russian men in Moscow region.

The association of the polymorphisms *MTHFR* rs1801131 and *MTR* rs 1805087; *CAT* (rs 1001179); *GSTP1* rs1695 and *GSTP1* rs1138272 with risk of teratozoospermia and asthenozoospermia is revealed by our study. The novel polymorphism *SEPS1* rs28665122 was detected as risk factor of pathospermia.

The results obtained in this study can provide the genetic testing for men with pathospermia before pregnancy to choose the appropriate therapy. The data on frequencies on alleles and genotypes of studied genes obtained in this study has highlighted the knowledge of the genetic structure of Moscow region population.

Подписано в печать 28.12.2020 г.

Формат А5

Бумага офсетная. Печать
цифровая. Тираж 100 Экз. Заказ
№ХП-238396-12-20 Типография

ООО “МДМпринт”

(Печатный салон МДМ)

г. Москва, ул.Покрышкина д.4

Тел. 8-495-256-10-00