

АССОЦИАЦИЯ ПОЛИМОРФИЗМОВ –262 С>Т ГЕНА САТ И G/A ГЕНА PDE7B С РИСКОМ МУЖСКОГО БЕСПЛОДИЯ

ASSOCIATION OF POLYMORPHISMS –262 C >T OF CAT GENE AND G/A OF PDE7B GENE WITH THE RISK OF MALE INFERTILITY

**G. Myandina
H. Alhejoi
N. Kulchenko**

Summary. The paper studies the effect of polymorphisms –262 C >T of cat catalase gene and g/a of pde7b phosphodiesterase gene on the development of pathospermia among infertile men in the Moscow region. Infertility affects 10–15% of couples worldwide and in 50% of cases is caused by fertility disorders in men [1]. Despite significant advances in reproductive technologies and diagnostic methods, the etiology of 50% of male infertility cases remains unknown. Since more than 2,300 genes are involved in spermatogenesis, polymorphisms in many as yet unidentified genes may affect sperm quality and male reproductive function. In this article, a study was conducted in which 138 men participated. During the study, a genetic analysis of DNA isolated from the peripheral blood leukocytes of infertile and fertile men was carried out. All DNA samples studied for the presence of polymorphisms using the methods of polymerase chain reaction (PCR) of DNA synthesis in real time (Real-Time-PCR). Ready-made sets for polymorphism determination were used for PCR ("Sintol" company).

Keywords: male infertility, genetic factor, gene CAT, PDE7B, polymorphism.

Мяндина Галина Ивановна

Д.б.н., профессор, Российский университет дружбы народов

myandina_gi@pfur.ru

Альхеджой Хасан Мохаммад Хасан

Аспирант, Российский университет дружбы народов

alhejoj_hasan@mail.ru

Кульченко Нина Геннадиевна

К.м.н., врач уролог, врач ультразвуковой диагностики, старший преподаватель, Российский университет

дружбы народов

kle_kni@mail.ru

Аннотация. В данной статье изучено влияние полиморфизмов –262 С >Т гена каталазы САТ и G/A гена фосфодиэстеразы PDE7B на развитие патоспермии среди бесплодных мужчин Московского региона. Бесплодие поражает 10–15% пар во всем мире и в 50% случаев обусловлено нарушением фертильности у мужчин [1]. Несмотря на значительные успехи в репродуктивных технологиях и диагностических методах, этиология 50% случаев мужского бесплодия остается неизвестной. Поскольку в сперматогенезе участвуют более 2300 генов, полиморфизмы многих, еще не идентифицированных генов, могут влиять на качество спермы и репродуктивную функцию мужчин. В данной статье проведено исследование, в котором приняли участие 138 мужчин. В ходе исследования был проведен генетический анализ ДНК, выделенной из лейкоцитов периферической крови бесплодных и фертильных мужчин. Все образцы ДНК изучали на наличие полиморфизмов с использованием методов полимеразной цепной реакции (ПЦР) синтеза ДНК в режиме реального времени (Real-Time-PCR). Для ПЦР использовали готовые наборы для определения полиморфизмов (компания «Синтол»).

Ключевые слова: мужское бесплодие, генетические факторы, ген САТ, PDE7B, полиморфизм, патоспермия.

По оценкам, бесплодие влияет на 10–15% пар, в 50% случаев обусловлено нарушением фертильности у мужчин [1]. Несмотря на значительные успехи в репродуктивных технологиях и диагностических методах, этиология около 50% случаев мужского бесплодия остается неизвестной [2]. Было высказано предположение, что генетические факторы определяют 15–30% случаев бесплодия среди мужчин [3]. Доказанные генетические факторы, связанные с мужским бесплодием, включают микроделеции Y-хромосомы, хромосомные или моногенные нарушения, мутации митохондриальной ДНК, нарушения импринтинга или эндокринные нарушения генетического происхождения [4]. Нарушение сперматогенеза является наиболее распространенной формой мужского бесплодия, и многие генетические факторы участвуют в нарушении сперматогенеза как ключевого этапа репродуктивной функции мужчин [4, 5].

Реактивные формы кислорода (ROS) представляют собой свободные радикалы, имеющие, по меньшей мере, один неспаренный электрон и включают молекулы, такие как гидроксильный ион (OH), супероксидный ион (O₂), пероксидный радикал (RO₂) или перекись водорода (H₂O₂). ROS происходят из клеточных реакций в качестве побочных продуктов метаболизма кислорода и обычно нейтрализуются гомеостатической антиоксидантной системой. ROS, присутствующие в семенной плазме, могут происходить как из эндогенных, так и из экзогенных источников; эндогенные источники могут быть получены из-за большого числа лейкоцитов в семенной плазме и переизбытка незрелых сперматозоидов (сперматозоидов с остаточной цитоплазмой) в эякуляте пациентов с варикоцеле [17, 18]. ROS в семенной плазме может также происходить из экзогенных источников, таких как воздействие ионизирующего из-

лучения, цитотоксинов или вредных привычек, включая курение сигарет или чрезмерное потребление алкоголя [19].

Присутствие ROS в семенной плазме обычно сбалансировано с помощью гомеостатических антиоксидантных систем, которые обеспечивают соответствующий уровень ROS, необходимый для нормальных физиологических процессов, таких как гиперактивация, акросомная реакция и слияние сперматозоидов. В некоторых случаях может возникнуть несбалансированный потенциал REDOX (окислительно-восстановительный потенциал, мера окислительного стресса, определяемая как все известные и неизвестные доноры окислительного стресса) из-за повышенного содержания ROS, которое превышает способность противостоять антиоксидантным системам. В таких условиях высокие уровни ROS в семенной плазме могут не только вызывать повреждение сперматозоидов, но также перекисное окисление липидов, снижение текучести мембран и апоптоз [20, 21].

Когда гомеостаз между генерацией и устранением ROS нарушается, реактивные молекулы могут привести к повреждению ДНК [6], поэтому погашение избытка ROS является обязательным условием для нормального сперматогенеза и оплодотворения. Повреждение ДНК в сперматозоидах, по-видимому, связано с уменьшением скорости оплодотворения, нарушением преимплантации и увеличением частоты выкидышей и заболеваемости у потомства [7–13].

Ферментативные антиоксидантные системы в семенной плазме представляют собой группу ферментов, которые включают супероксиддисмутазу марганца (SOD2), каталазу (CAT), глутатионпероксидазу 1 (GPX1) и глутатион-S-трансферазу (GST) [22]. SOD2 представляет собой фермент, который катализирует детоксикацию супероксидных радикалов в митохондриях [23]. CAT способен детоксифицировать H_2O_2 , превращая его в H_2O и O_2 [25]. Фермент GPX1 связан с конечным переносчиком электронов и нейтрализует пероксидные радикалы в H_2O , тогда как GST катализирует конъюгацию глутатиона с токсическими метаболитами и радикалами экзогенных повреждающих веществ, причем глутатион нейтрализует их токсичность [26].

В исследованиях М.В. Быковой с соавт. (2008) было установлено, что у русских мужчин с патоспермией происходит интенсификация процессов перекисного окисления липидов (ПОЛ) как в семенной плазме, так и в спермиях по сравнению с нормозооспермией [27]. Патоспермия сопровождается снижением активности большинства антиоксидантных ферментов (каталазы, глутатионпероксидазы, глутатион-S-трансферазы) и уменьшением содержанием восстановленного глута-

тиона в спермиях и семенной плазме на фоне повышения активности супероксиддисмутазы.

Фермент CAT, локализован в хромосоме 11p13 и является основным ферментом при детоксикации H_2O_2 до H_2O . Полиморфизмный локус $-262C>T$ (rs1001179) находится в области промотора гена CAT и влияет на уровень экспрессии гена CAT и активность фермента [31]. Перекись водорода H_2O_2 вызывает перекисное окисление липидов, что сопровождается снижением текучести мембраны, которое приводит к снижению подвижности сперматозоидов [28]. Было показано, что семенная плазма бесплодных пациентов имеет более высокую концентрацию H_2O_2 и более низкую активность CAT, чем у здоровых мужчин [29]. Недавние исследования также показали, что внешняя добавка с CAT к криоконсервирующей сперме улучшает подвижность и жизнеспособность сперматозоидов [30].

Циклические нуклеотидные фосфодиэстеразы (PDE) — это суперсемейство ферментов, которое разделяется на 11 семейств (PDE1–11), которые играют ключевую роль в метаболизме циклического аденозинмонофосфата (цАМФ) и циклического гуанозинмонофосфата (цГМФ). PDE функционируют совместно с аденилатциклазами (АЦ) и гуанилатциклазами (ГЦ) в регуляции амплитуды и продолжительности внутриклеточных сигнальных механизмов, опосредованных через цАМФ и цГМФ. Как было показано в работе Dimitriadis, F.D. et al. (2008), увеличение уровня внутрицитозольного цАМФ приводит к повышению подвижности и жизнеспособности сперматозоидов. Стимуляции цГМФ низкими дозами оксида азота (NO) приводит к улучшению или поддержанию подвижности сперматозоидов, тогда как более высокие концентрации оказывают неблагоприятное влияние на параметры сперматозоидов [14]. В литературе отсутствуют данные, указывающие на влияние полиморфизма G/A (rs7774640) гена PDE7B на мужскую фертильность, однако, учитывая важную роль этого фермента в регуляции внутриклеточных сигнальных механизмов и инактивировании протеин киназы А, представляется весьма вероятной ее роль в регуляции сперматогенеза.

Цель исследования: изучить влияние полиморфизмов $-262C>T$ гена каталазы CAT T (rs1001179) и G/A гена фосфодиэстеразы PDE7B (rs7774640) на развитие патоспермии среди бесплодных мужчин Московского региона.

Материалы и методы

Для решения поставленных перед научным исследованием задач, было обследовано 138 человек из них 70 больных (1-я группа) с патоспермией (средний возраст 30 ± 2) и 68 (2-я группа) фертильных мужчин (средний

Таблица 1. Распределение частот генов и генотипов (CAT C262T и PDE7B G/A) среди пациентов с бесплодием и фертильных мужчин

SNP	Генотип	Инфертильные % (n)	Контроль % (n)	χ^2	Odd ratio	95% ДИ	Значение P
	CC	0.5 (35)	0.69 (47)				
CAT C\T	CT	0.4 (28)	0.28 (19)	6.2296	4.7	3.06–6.33	0.044
	TT	0.10 (7)	0.02 (2)				
	CT+TT	0.50 (35)	0.30 (21)	5.2282	2.23	1.54–2.93	0.022
	Аллель C	0.70	0.83				
	Аллель T	0.30	0.17	4.700	2.09	1.41–2.76	0.030
PDE7b	GG	0.39 (27)	0.46 (31)				
	GA	0.42 (30)	0.43 (29)	1.45	1.86	0.84–2.88	0.483
	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
	Аллель G	0.60	0.67				
	Аллель A	0.40	0.33	1.0570	1.35	0.77–1.93	0.303

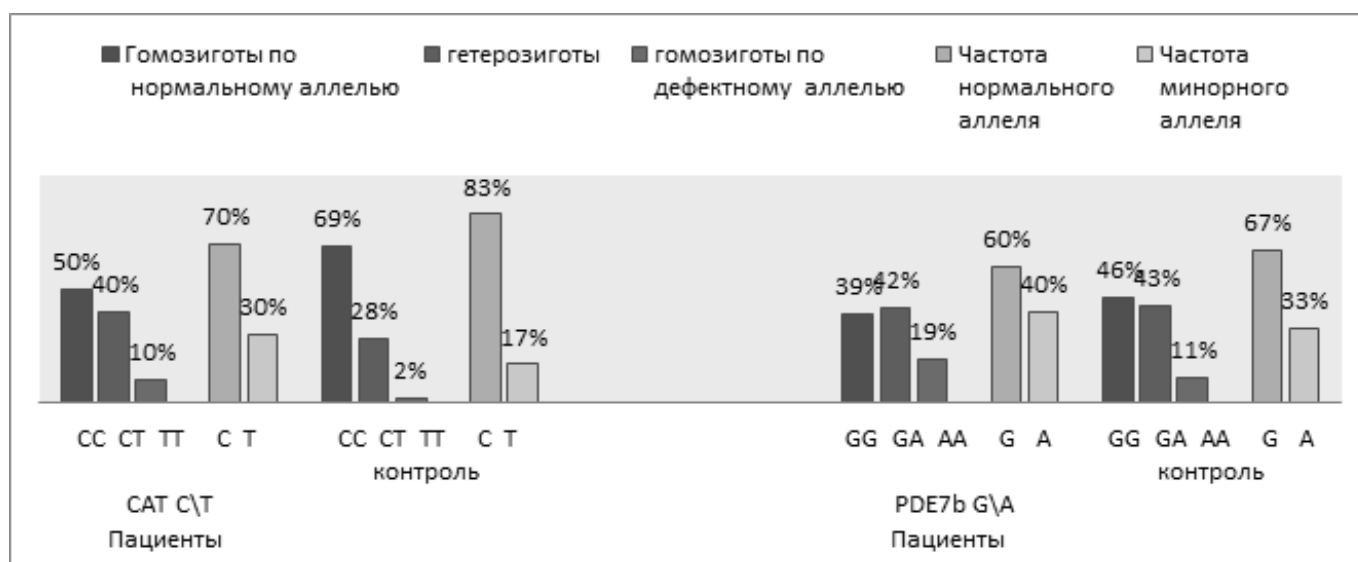


Рис. 1. Выраженность частот генотипов и аллелей генов CAT и PDE7B у пациентов с патоспермией и фертильных мужчин

возраст 29± 4). В исследуемую группу включали пациентов, репродуктивная состоятельность жен которых была подтверждена клинически.

В качестве ДНК-матрицы использовали геномную ДНК, полученную из лейкоцитов крови с использованием набора «ДНК-ЭКСТРАН-1-кровь» производства ООО «Синтол» (Россия). Образцы ДНК изучали на наличие полиморфизмов с использованием методов полимеразной цепной реакции (ПЦР) синтеза ДНК в режиме реального времени (Real-Time-PCR). Для ПЦР использовали готовые наборы для определения полиморфизмов

(компания «Синтол»). ПЦР выполнили на амплификаторе CFX96 (Bio-Rad) с программным обеспечением CFX Manager™.

Сравнение частот встречаемости аллелей исследуемых SNP в популяциях проводили с помощью критерия χ^2 , OR (отношение шансов), 95% ДИ (доверительный интервал) и программы Statistica 6.0. тест на соответствие распределения генотипов в выборках равновесию Харди-Вайнберга — с использованием точного критерия (Exact test). Различия считали статистически значимыми при $p < 0,05$.

Результаты исследования

Гомозиготный генотип 262CC обнаружен у 35 больных, что составляет 50%; гетерозиготный генотип 262CT зарегистрирован у 28 пациентов, что составляет 40%; у 7 пациентов выявлен генотип 262TT, что составляет 10%. Частота носителей аллеля 262T (генотипы СТ+ТТ) в исследуемой группе пациентов с патоспермией составляет 0.50, в группе фертильных мужчин — 0.30 ($p=0.022$).

Анализ распределения частоты минорного аллеля 262T гена CAT среди пациентов с патоспермией и в контрольной группе составляет 0.30 и 0.17, соответственно ($p=0.044$).

Для полиморфизма A/G гена PDE7B частота гомозигот GG в группе мужчин с патоспермией составляет 39%; гетерозиготы PDE7B GA выявлены в 42%; частота гомозигот AA составила 19%. В группе фертильных мужчин частоты генотипов GG, GA и AA составили 0.46, 0.41 и 0.11, соответственно ($p=0.48$). Частоты носителей генотипов (GA+AA) среди бесплодных мужчин составляет 0.61, среди фертильных — 0.54 ($p=0.40$). Среди пациентов с патоспермией и мужчин контрольной группы частота аллельного варианта **A** гена PDE7B составляет 0.40 и 0.33, соответственно ($p>0.05$). Распределение частот генов и генотипов (CAT C262T и PDE7b G/A) среди пациентов с бесплодием и фертильных мужчин Московского региона представлено в таблице 1 и на рис. 1.

Обсуждение и выводы

Каталаза (CAT), ключевой фермент для выведения H_2O_2 , совместно с супероксидом дисмутаза (SOD) и глутатионпероксидазой (GPX), составляет основную ферментативную антиоксидантную систему. Фермент каталаза играет важную роль в семенной антиоксидантной защите и присутствует в семенной плазме в высоких концентрациях. Низкие концентрации фермента каталазы в семенной плазме связаны с мужским бесплодием [6]

Согласно базе данных <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/snp/?term=CAT>, <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/snp/?term=PDE7B> частоты аллеля 262T CAT по Global MAF составляют 0.85–0.1, частоты аллеля A PDE7B составляют 0.64–0.35 в разных популяциях. В наших исследованиях частоты аллелей 262T и A PDE7B в группе фертильных

мужчин составляет 17% и 33%, что согласуется с частотами этих аллелей по Global MAF. Распределения генотипов CC, CT, TT, GG, GA и AA в контрольной группе фертильных мужчин составляет 69%; 28%, 2%, 46%, 43%, и 11%, и соответствует равновесию Харди-Вайнберга

Исследования роли полиморфизма 262T гена CAT (rs1001179) в развитии патоспермии показали, что распределение генотипов гена CAT C262T среди мужчин с патоспермией статистически значимо отличалось от распределения частот генотипов в группе фертильных мужчин ($p=0.044$). Частота носителей аллеля 262T в группе бесплодных мужчин с патоспермией почти в полтора раза выше, чем в группе фертильных мужчин и составляет 0.30 и 0.17, что статистически достоверно значимо ($p=0.03$). Результаты нашей работы согласуются с результатами исследований, проведенных другими авторами в испанской и австрийской популяциях [15, 16].

В литературе нет данных указывающих на влияние полиморфизма G/A (rs7774640) гена PDE7B на мужскую фертильность. Исследования полиморфизм G/A (rs7774640) гена PDE7B в Российской Федерации не проводились. Представляется весьма актуальным изучение ассоциации данного полиморфизма с развитием патоспермии среди мужчин московского региона. Анализ частот генов и генотипов по полиморфному локусу G/A гена PDE7B(rs7774640) не выявил статистически значимых различий среди пациентов с патоспермией и фертильных мужчин ($p>0.05$). возможно, исследования роли полиморфизма G/A гена PDE7B(rs7774640) следует провести на большей выборке пациентов с патоспермией.

Заключение

Аллель –262T гена каталазы CAT может рассматриваться как генетический фактор риска развития патоспермии у мужчин с бесплодием. Не выявлена ассоциация полиморфизма G/A гена фосфодиэстеразы PDE7B с развитием патоспермии у мужчин с бесплодием.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии возможных конфликтов интересов.

Информация о финансировании. Публикация подготовлена при поддержке Программы РУДН «5–100».

ЛИТЕРАТУРА

1. Lu C, Zhang J, Li Y, Xia Y, Zhang F, Wu B, et al. The b2/b3 subdeletion shows higher risk of spermatogenic failure and higher frequency of complete AZFc deletion than the gr/gr subdeletion in a Chinese population. *Hum Mol Genet.* 2009;18(6):1122–30.
2. Patrizio P, Leonard DG, Chen KL, Hernandez-Ayup S, Trounson AO. Larger trinucleotide repeat size in the androgen receptor gene of infertile men with extremely severe oligozoospermia. *J Androl.* 2001;22(3):444–8.

3. Ferlin A, Raicu F, Gatta V, Zuccarello D, Palka G, Foresta C. Male infertility: role of genetic background. *Reprod BioMed Online*. 2007;14(6):734–45.
4. Shamsi MB, Kumar K, Dada R. Genetic and epigenetic factors: Role in male infertility. *Indian J Urol IUU J Urol Soc India*. 2011;27(1): 110–20.
5. Chen H, Pu XY, Zhang RP, A ZC. Association of common SNP rs1136410 in PARP1 gene with the susceptibility to male infertility with oligospermia. *J Assist Reprod Genet*. 2014.
6. De Lamirande, E.; Gagnon, C. Human sperm hyperactivation and capacitation as parts of an oxidative process. *Free Radic. Biol. Med.* 14:157–166; 1993.
7. Borini, A.; Tarozzi, N.; Bizzaro, D.; Bonu, M. A.; Fava, L.; Flamigni, C.; Coticchio, G. Sperm DNA fragmentation: paternal effect on early post-implantation embryo development in ART. *Hum. Reprod.* 21:2876–2881; 2006.
8. Lewis, S. E.; Aitken, R. J. DNA damage to spermatozoa has impacts on fertilization and pregnancy. *Cell Tissue Res*. 322:33–41; 2005.
9. Carrell, D. T.; Liu, L.; Peterson, C. M.; Jones, K. P.; Hatasaka, H. H.; Erickson, L.; Campbell, B. Sperm DNA fragmentation is increased in couples with unexplained recurrent pregnancy loss. *Arch. Androl.* 49:49–55; 2003.
10. Seli, E.; Gardner, D. K.; Schoolcraft, W. B.; Moffatt, O.; Sakkas, D. Extent of nuclear DNA damage in ejaculated spermatozoa impacts on blastocyst development after in vitro fertilization. *Fertil. Steril.* 82:378–383; 2004.
11. Aitken, R. J.; De Iulii, G. N.; McLachlan, R. I. Biological and clinical significance of DNA damage in the male germ line. *Int. J. Androl.* 32:46–56; 2009.
12. Zini, A.; Boman, J. M.; Belzile, E.; Ciampi, A. Sperm DNA damage is associated with an increased risk of pregnancy loss after IVF and ICSI: systematic review and meta-analysis. *Hum. Reprod.* 23:2663–2668; 2008.
13. Barratt, C. L.; Aitken, R. J.; Bjorndahl, L.; Carrell, D. T.; de Boer, P.; Kvist, U.; Lewis, S. E.; Perreault, S. D.; Perry, M. J.; Ramos, L.; Robaire, B.; Ward, S.; Zini, A. Sperm DNA: organization, protection and vulnerability: from basic science to clinical applications — a position report. *Hum. Reprod.* 25:824–838; 2010.
14. Dimitriadis, F. D. et al. Effects of phosphodiesterase 5 inhibitors on sperm parameters and fertilizing capacity. *Asian J Androl* 2008; 10 (1): 115–133.
15. Garcia-Rodriguez. et al. CAT-262CT Genotype shows higher catalase activity in seminal plasma and lower risk of male infertility. *Mgene* (2018), doi:10.1016/j.mgene.2018.07.011.
16. Anaís García Rodríguez et al. Association of polymorphisms in genes coding for antioxidant enzymes and human male infertility. *Ann Hum Genet*. 2018;1–10.
17. Agarwal A, Makker K, Sharma R (2008) Clinical relevance of oxidative stress in male factor infertility: an update. *Am J Reprod Immunol* 59:2–11.
18. Allamaneni SSR, Naughton CK, Sharma RK, Thomas AJ, Jr., Agarwal A. Increased seminal reactive oxygen species levels in varicocele patients correlate with varicocele grade, not testis size. *Fertil Steril* 2004.
19. Agarwal A, Virk G, Ong C, du Plessis SS. Effect of oxidative stress on male reproduction. *World J Mens Health* 2014;32:1–17.
20. Aitken RJ, Gibb Z, Baker MA, Drevet J, Gharagozloo P. Causes and consequences of oxidative stress in spermatozoa. *Reprod Fertil Dev*. 2016;28:1–10.
21. Aitken RJ, Smith TB, Jobling MS, Baker MA, De Iulii GN. Oxidative stress and male reproductive health. *Asian J Androl*. 2014;16:31–38.
22. O'Flaherty C. Peroxiredoxins: hidden players in the antioxidant defence of human spermatozoa. *Basic Clin Androl*. 2014;24:4.
23. Yan L, Guo W, Wu S, Liu J, Zhang S, Shi L, et al. (2014) Genetic Variants in Nitric Oxide Synthase Genes and the Risk of Male Infertility in a Chinese Population: A Case-Control Study. *PLoS ONE*9(12): e115190.
24. Sabouhi S, Salehi Z, Bahadori M H, M ahdavi M (2014) Human catalase gene polymorphism (CAT C-262T) and risk of male infertility. *Andrologia*. doi:10.1111/and.12228.
25. Tefik T., Kucukgergin C., Sanli O., Oktar T., Seckin S., Ozsoy C. Manganese superoxide dismutase Ile58Thr, catalase C-262T and myeloperoxidase G-463A gene polymorphisms in patients with prostate cancer: relation to advanced and metastatic disease. *BJU Int* 2013; 112: 4: E406—E414.
26. Olshan AF, Luben TJ, Hanley NM, Perreault SD, Chan RL, et al. Preliminary examination of polymorphisms of GSTM1, GSTT1, and GSTZ1 in relation to semen quality. *Mutat Res* 2010; 688: 41–6.
27. Быкова М.В., Титова Н. М., Маркова Е. В., Светлаков А. В. Про-антиоксидантный статус в сперматозоидах и семенной плазме мужчин при патоспермии // Проблемы Репродукции. — 2008. — № 3. — С. 63 — 67.
28. Kemal Duru N, Morshedi M, Oehninger S. Effects of hydrogen peroxide on DNA and plasma membrane integrity of human spermatozoa. *Fertil Steril*. 2000; 74 (6): 1200–7.
29. Zelen I., Mitrović M., Jurisic-Skevin A., Arsenijević S. Activity of superoxide dismutase and catalase and content of malondialdehyde in seminal plasma of infertile patients. *Medicinski Pregled*. 2010;63(9–10):624–629.
30. Moubasher AE, El Din AM, Ali ME, El-sherif WT, Gaber HD. Catalase improves motility, vitality and DNA integrity of cryopreserved human spermatozoa. *Andrologia*. 2013; 45:135–9.
31. Forsberg L., Lyrenas L., de Faire U., Morgenstern R. A common functional C-T substitution polymorphism in promoter region of human catalase gene influences transcription factor binding, reporter gene transcription and is correlate to blood catalase levels// *Free Radical Biology and medicine*. 2001.vol.30(5): P. 500–505.

© Мяндина Галина Ивановна (myandina_gi@pfur.ru), Альхеджой Хасан Мохаммад Хасан (alhejoj_hasan@mail.ru),
Кульченко Нина Геннадиевна (kle_kni@mail.ru).

Журнал «Современная наука: актуальные проблемы теории и практики»