

Метилирование гена *SNRPN* у мужчин с бесплодием при отсутствии мутаций в известных генах-кандидатах снижения фертильности

Д.С. Михайленко^{1,2}, О.А. Симонова¹, И. Аль-Акел³, И.Ю. Соболев³, Т.А. Едоян⁴, Е.А. Ефремов³,
Е.Б. Кузнецова², М.В. Немцова^{1,2}

¹ФГБНУ «Медико-генетический научный центр им. акад. Н.П. Бочкова»; Россия, 115522 Москва, ул. Москворечье, 1;

²ФГАОУ ВО Первый Московский государственный медицинский университет им. И.М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский Университет); Россия, 119991 Москва, ул. Трубецкая, 8;

³Научно-исследовательский институт урологии и интервенционной радиологии им. Н.А. Лопаткина – филиал ФГБУ «НМИЦ радиологии» Минздрава России; Россия, 105425 Москва, ул. 3-я Парковая, 51, стр. 1;

⁴ФГАОУ ВО «Российский национальный исследовательский медицинский университет им. Н.И. Пирогова» Минздрава России; Россия, 117997 Москва, ул. Островитянова, 1

Контакты: Дмитрий Сергеевич Михайленко dimserg@mail.ru

Введение. Бесплодие у мужчин представляет собой актуальную проблему современной андрологии и встречается в 45 % бесплодных браков. Часть случаев бесплодия у мужчин обусловлена генетическими причинами: точковыми мутациями при ряде моногенных заболеваний, делециями локуса AZF или сочетанием мутаций *CFTR*; сниженная фертильность ассоциирована также с полиморфными вариантами генов *AR* и *GSTT1/GSTM1*. Вместе с тем публикуют все больше данных о роли эпигенетических механизмов в виде aberrантного метилирования и нарушения импринтинга в патологии сперматогенеза.

Материалы и методы. В настоящей работе нами исследованы 49 образцов ДНК, полученных из образцов спермы неродственных мужчин с бесплодием, с помощью полимеразной цепной реакции, фрагментного анализа и секвенирования.

Результаты. Из первоначальной когорты исключены 5 пациентов: 1 – с длиной повтора 29 (CAG) в экзоне 1 *AR*, 3 – с нулевыми генотипами по генам *GSTT1* и *GSTM1*, 1 – компаунд гетерозигота delF508/5T по гену *CFTR*. После этого с помощью метилспецифической полимеразной цепной реакции и бисульфитного секвенирования было определено метилирование импринтированного гена *SNRPN*. Показано, что aberrантное метилирование *SNRPN* встречается в 11,4 % случаев мужского бесплодия. Суммарно молекулярно-генетические и эпигенетические нарушения были выявлены у 20 % пациентов.

Заключение. Полученные данные демонстрируют значительную долю (эпи)генетических нарушений в гетерогенной выборке мужчин со сниженной фертильностью.

Ключевые слова: мужское бесплодие, метилирование ДНК, импринтинг, делеции AZF, мутации *CFTR*, полиморфизмы *AR*, *GSTM1* и *GSTT1*, секвенирование, ПЦР

Для цитирования: Михайленко Д.С., Симонова О.А., Аль-Акел И. и др. Метилирование гена *SNRPN* у мужчин с бесплодием при отсутствии мутаций в известных генах-кандидатах снижения фертильности. Андрология и генитальная хирургия 2021;22(1):52–61. DOI: 10.17650/1726-9784-2021-22-1-52-61

Methylation of the *SNRPN* gene in infertile men without mutations in common candidate genes for reduced fertility

D.S. Mikhaylenko^{1,2}, O.A. Simonova¹, I.El Akel³, I.Yu. Sobol³, T.A. Edoyan⁴, E.A. Efremov³, E.B. Kuznetsova², M.V. Nemtsova^{1,2}

¹N.P. Bochkov Research Centre for Medical Genetics; 1 Moskvorech'e St., Moscow 115522, Russia;

²I.M. Sechenov First Moscow State Medical University (Sechenov University), Ministry of Health of Russia; 8 Trubetskaya St., Moscow 119991, Russia;

³N.A. Lopatkin Scientific Research Institute of Urology and Interventional Radiology – branch of the National Medical Research Radiological Center, Ministry of Health of Russia; Bld. 1, 51 3rd Parkovaya St., Moscow 105425, Russia;

⁴N.I. Pirogov Russian National Research Medical University, Ministry of Health of Russia; 1 Ostrovityanova St., Moscow 117997, Russia

Contacts: Dmitry Sergeevich Mikhaylenko dimserg@mail.ru

Introduction. Male infertility is a common problem in andrology and occurs in 45 % of infertile couples. Some cases of male infertility caused by genetic reasons: point mutations at some monogenic diseases, AZF deletions or a *CFTR* mutation compounds; reduced fertility is also associated with polymorphic variants of the genes *AR* and *GSTT1/GSTM1*. At the same time, increasing amount of data are being published about the role of epigenetic mechanisms (aberrant methylation and imprinting alterations) in defective spermatogenesis.

Materials and methods. We have studied 49 sperm samples obtained from unrelated infertile men using polymerase chain reaction, fragment analysis, and sequencing.

Results. Five patients were excluded from the initial cohort: one with a repeat length of 29 (CAG) in the first exon of the *AR*, three with null genotypes in the *GSTT1* and *GSTM1*, and one with the delF508/5T heterozygous compound in the *CFTR*. Thereafter, methylation of the imprinted gene *SNRPN* was determined using methyl-specific polymerase chain reaction and bisulfite sequencing. Aberrant *SNRPN* methylation was detected in 11.4 % of male infertility samples. In total, molecular genetic and epigenetic alterations were determined in 20 % of patients.

Conclusions. Obtained data demonstrate a significant proportion of (epi)genetic disorders in a heterogeneous cohort of men with reduced fertility.

Key words: male infertility, DNA methylation, imprinting, AZF deletions, *CFTR* mutations, polymorphisms of the *AR*, *GSTM1* and *GSTT1*, sequencing, PCR

For citation: Mikhaylenko D.S., Simonova O.A., El Akel I. et al. Methylation of the *SNRPN* gene in infertile men without mutations in common candidate genes for reduced fertility. *Andrologiya i genital'naya khirurgiya = Andrology and Genital Surgery* 2021;22(1):52–61. (In Russ.). DOI: 10.17650/1726-9784-2021-22-1-52-61

Введение

Бесплодие у мужчин представляет собой актуальную проблему современной андрологии и встречается в той или иной форме в 45 % бесплодных браков [1]. При диагностике мужского бесплодия поэтапно исключают частые причины заболевания: травмы, варикоцеле, аномалии развития, системные заболевания, прием стероидов, инфекции мочеполовой системы, хронические стрессы, иммунологические нарушения и другие патологические изменения. Часть случаев бесплодия у мужчин обусловлена генетическими причинами в виде точковых мутаций, среди которых можно выделить как редкие моногенные заболевания (синдромы Кальмана, Картагенера и др.), так и более частые случаи азооспермии, обусловленные делециями локуса AZF (azoospermia factor) или сочетанием мутаций *CFTR* [2, 3].

Микроделеции Y-хромосомы, затрагивающие область AZF, могут включать субрегионы AZFa, b и/или c и приводить к утрате генов, участвующих в регуляции сперматогенеза. Одновременные делеции субрегионов AZFa, b или нескольких субрегионов становятся причиной азооспермии, частичные делеции субрегиона AZFc могут привести к олигозооспермии [4]. Ген *CFTR* кодирует трансмембранный регулятор проводимости, который участвует в транспорте ионов хлора через плазматическую мембрану и формировании секрета эпителиальных клеток. Компонд-гетерозиготы по тяжелой и мягкой мутациям *CFTR* имеют измененную концентрацию ионов хлора и электролитов, повышенную вязкость секрета в мелких протоках желез внешней секреции, что ассоциировано с агенезией семявыносящих протоков (congenital bilateral absence of the vas deferens, CBAVD) [5].

Наряду с точковыми мутациями ряд авторов выделяют в качестве возможных причин бесплодия у мужчин неблагоприятные аллели полиморфизмов гена андрогенового рецептора (*AR*) и генов семейства глутатионтрансфераз. Андрогены играют важную роль в сперматогенезе, реализуя свое действие через андрогеновый рецептор. В экзоне 1 гена *AR* расположен полиморфный CAG-повтор, соответствующий полиглутаминовому тракту переменной длины. Длина повтора обратно пропорциональна способности рецептора активировать транскрипцию генов-мишеней, что может иметь значение в патогенезе бесплодия у носителей длинных аллелей [6]. Гены *GSTM1* и *GSTT1* кодируют глутатионтрансферазы – ферменты, которые участвуют в детоксикации ксенобиотиков и защите макромолекул от перекисного окисления. Гомозиготы по аллелям с делециями этих генов (нулевые генотипы) характеризуются повышенным риском развития ряда мультифакториальных заболеваний, в том числе мужского бесплодия [7, 8]. Наличие неблагоприятных аллелей указанных полиморфизмов само по себе не является причиной бесплодия, однако увеличивает риск идиопатического мужского бесплодия относительно среднепопуляционного уровня.

Часть патологических генетических изменений у человека выражается не в структурных нарушениях последовательности нуклеотидов ДНК, а в эпигенетической патологии – aberrантном метилировании регуляторных районов генома. Метилирование заключается в обратимом присоединении метильной группы к цитозину в 5'-положении пиримидинового кольца, причем метилированию подвергаются только цитозины в составе CpG-динуклеотидов. Метилирование

играет важную роль в поддержании стабильности генома и регуляции генной экспрессии. Аберрантное метилирование имеет место при различных патологических процессах, в частности при аномалиях развития и канцерогенезе [9]. С метилированием ДНК связан также импринтинг — способ регуляции экспрессии гена в зависимости от его родительского происхождения. Большинство генов человека имеют биаллельную экспрессию, или выбор экспрессирующегося аллеля в клетке происходит стохастически. Однако некоторые гены собраны в кластеры, где они экспрессируются либо только с материнского, либо с отцовского аллеля, при этом репрессия оставшегося аллеля осуществляется с помощью гиперметилирования. Нарушение метилирования в регуляторных центрах импринтинга лежит в основе патогенеза таких заболеваний, как синдромы Видемана—Беквита, Прадера—Вилли, Ангельмана и ряда других [10].

Метаанализ 24 оригинальных работ показал, что достоверное изменение частоты метилирования в сперматозоидах при бесплодии наблюдали в генах *BRDT*, *CFTC-6*, *CREM*, *DAZL*, *FAM50B*, *GNAS*, *GTL2*, *H19*, *IGF2*, *KCNQ10T1*, *LIT1*, *MEG3*, *MEST*, *PEG3*, *RHOX*, *SNRPN* и *ZAC*. Однако наиболее воспроизводимые результаты, подтвержденные в 3 и более независимых исследованиях ($p < 0,001$), свидетельствовали об изменениях в частоте метилирования 3 импринтированных генов. Деметилирование было характерно для гена *H19*, гиперметилирование — для генов *SNRPN* и *MEST* [11]. Позднее исследование 74 пациентов с бесплодием и 50 участников контрольной группы позволило авторам предложить эпигенетическую панель, которая дала возможность корректно классифицировать около 70 % обследуемых мужчин. Она включала CpG-динуклеотиды 1, 6–9, 12 и 15–16 в промоторе *H19*, а также 2, 5–6, 8–10, 13 и 16 — *SNRPN* [12]. Аберрантное метилирование *SNRPN* при бесплодии представляет особый интерес, поскольку, в отличие от гена *MEST*, это нарушение отмечено и при других патологиях у человека (в частности, оставшиеся как результат однородительской дисомии только гиперметилированные материнские аллели являются причиной синдрома Прадера—Вилли), демонстрирует высокую частоту нарушений и представлено аберрантным метилированием отцовского аллеля, которое удобнее выявлять на фоне избытка неметилированных аллелей в образце спермы [11, 13].

Целью настоящей работы является комплексная оценка частоты генетических и эпигенетических нарушений генов-кандидатов мужского бесплодия в гетерогенной выборке российских пациентов.

Материалы и методы

Характеристика пациентов. Выборку составили 49 неродственных мужчин с бесплодием, средний возраст — $34,2 \pm 4,9$ года. По данным спермограммы у 14 пациентов была нормозооспермия, в большей

части выборки (33 пациента) наблюдали олигозооспермию различной степени выраженности, а также 2 случая азооспермии. От каждого пациента получали образец периферической крови из вены в вакуумную пробирку с консервантом ЭДТА и образец спермы в 1,5 мл микроцентрифужную пробирку. Все пациенты подписали информированное согласие на участие в исследовании. Работа одобрена локальным этическим комитетом ФГАОУ ВО Первый МГМУ им. И.М. Сеченова Минздрава России.

Выделение ДНК. Геномную ДНК из крови выделяли с помощью набора ДНК-сорб-В (ЦНИИЭ Роспотребнадзора, Россия). Образцы спермы объемом 100 мкл предварительно отмывали в фосфатно-солевом буфере, центрифугировали при 10 тыс. г 5 мин, затем добавляли 100 мкл реагента Муколизин (ЦНИИЭ Роспотребнадзора, Россия), перемешивали, инкубировали при комнатной температуре 20 мин, затем центрифугировали при 10 тыс. г 5 мин. Полученный осадок использовали для выделения ДНК набором ДНК-сорб-В.

Бисульфитная конверсия. Обработку геномной ДНК бисульфитом натрия и последующие отмывки проводили с применением набора EpiTect Fast DNA Bisulfite Kit (50) (Qiagen, Германия).

Определение делеций AZF. Делеции области AZF выявляли методом мультиплексной полимеразной цепной реакции (ПЦР) с последующим электрофорезом в полиакриламидном геле (ПААГ) и окраской нитратом серебра. Амплифицировали по 3 STS-маркера в субрегионах AZFa, b и 4 — в AZFс (всего 12 локусов с учетом контрольных участков, разделенных по 4 мультиплексным ПЦР) в соответствии с разработанной нами ранее методикой [14].

Анализ мутаций CFTR. В настоящей работе определяли 8 частых мутаций гена *CFTR* (F508del, CFTRdel2,3 (21kb), I507del, 1677delTA, 2143delT, 2184insA, 394delTT и 5T) методом мультиплексной ПЦР и электрофореза в ПААГ, как это было предложено нами ранее [14].

Генотипирование по CAG-повтору AR. Участок экзона 1 гена *AR*, содержащий CAG-повтор, амплифицировали с участием прямого и обратного праймеров, последний из которых был конъюгирован с флуорофором FAM (см. таблицу). Затем определяли длину ПЦР-продукта методом фрагментного анализа на капиллярном секвенаторе 3500xl. Полученные значения в п. н. сравнивали с положительными контрольными образцами ДНК мужчин с ранее секвенированными CAG-повторами известной длины. Программа амплификации — 95 °C 1 мин 45 с, затем 35 циклов 95 °C 40 с, 60 °C 30 с, 72 °C 20 с, финальная элонгация 72 °C 1 мин. Состав реакционной смеси ПЦР: 50–100 нг геномной ДНК, 2,5 mM MgCl₂, 1,5 mM каждого dNTP, по 2 пмоль конъюгированного с FAM прямого и обратного праймеров, 1 ед. термостабильной Taq-полимеразы, 5 мкл буфера для ПЦР 5x («ИнтерЛабСервис», Россия), объем смеси составлял 25 мкл. ПЦР проводили в амплификаторе Veriti 2.0 (Thermo Fisher Scientific, США).

Последовательности праймеров, используемые для исследования генов *AR*, *GSTM1*, *GSTT1* и *SNRPN*

Primer sequences used to study the *AR*, *GSTM1*, *GSTT1*, and *SNRPN* genes

Название гена Gene name	Праймер Primer	Последовательность, 5'–3' The sequence, 5'–3'	Длина ПЦР-продукта, п. н. Length of the PCR product, b. p.
<i>AR</i>	Прямой Forward	gtgcgcaagtgatccagaa	229–295
	Обратный Reverse	FAM-gctgtgaaggttctgttcctcat	
<i>GSTM1</i>	Прямой Forward	gaactccctgaaaagctaaagc	219
	Обратный Reverse	cttgggctcaaatatacgggtg	
<i>GSTT1</i>	Прямой Forward	ttccttactggctcctcacatctc	459
	Обратный Reverse	tcaccggatcatggccagca	
<i>CYP1B1</i>	Прямой Forward	cactgccaacacctgtcttg	129
	Обратный Reverse	aagaatcgagctggatcaaaagtc	
<i>SNRPN</i>	metF	cggtcgtagaggtaggtggcgc	131
	metR	ctcctcaacaatacgtcaaacatctccga	
	unmetF	gtgtggtgtagaggtaggttggtg	164
	unmetR	caactaaccttaccactccatcaca	

Примечание. ПЦР – полимеразная цепная реакция.

Note. PCR – polymerase chain reaction.

Анализ полиморфизма *GSTM1* и *GSTT1*. Инсерционно-делеционный полиморфизм генов *GSTM1* и *GSTT1* определяли с помощью мультиплексной ПЦР и электрофореза в ПААГ. В качестве внутреннего контроля амплифицировали фрагмент гена *CYP1B1*. Праймеры для ПЦР указаны в таблице, состав реакционной смеси и температурные параметры реакции аналогичны тем, которые применяли для амплификации САГ-повтора *AR*.

Метилспецифическая ПЦР. Статус метилирования исследуемого района гена *SNRPN* определяли методом метилспецифической ПЦР (МС-ПЦР). Праймеры для метилированного (metF и metR) и неметилированного (unmetF и unmetR) аллелей указаны в таблице. Программа амплификации – 96 °С 5 мин, затем 35 циклов 95 °С 40 с, 65 °С 1 мин, 72 °С 1 мин. Состав реакционной смеси ПЦР: 0,5 мкл раствора ДНК после бисульфитной конверсии, 1,5 мМ MgCl₂, 1,7 мМ каждого dNTP, по 2,5 пмоль прямого и обратного праймеров, 1 ед. термостабильной Taq-полимеразы, 2,5 мкл буфера для ПЦР 10x («СибЭнзим», Россия), объем смеси составлял 25 мкл.

Секвенирование по Сэнгеру. Статус метилирования отдельных CpG-динуклеотидов подтверждали методом

секвенирования по Сэнгеру. Предварительно 7 мкл ПЦР-продукта обрабатывали 1 е. а. щелочной фосфатазы («СибЭнзим», Россия) и 4 е. а. экзонуклеазы I из *E. coli* (Fermentas, Литва) для удаления непрореагировавших праймеров и dNTPs. Далее половину реакционной смеси использовали в реакции получения меченых фрагментов с помощью набора BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit, затем проводили очистку с применением реактивов BigDye X Terminator Purification Kit. Детекцию меченых фрагментов ДНК осуществляли на капиллярном секвенаторе 3500xl (Thermo Fisher Scientific, США) согласно протоколам производителя. Полученные хроматограммы анализировали в программе Chromas 2.6.6 (Technelysium, Австралия).

Статистический анализ данных. Частоты аллелей и генотипов сравнивали с помощью двустороннего точного критерия Фишера или критерия χ^2 при $\alpha = 0,05$. Длину САГ-повтора в исследуемой выборке сравнивали с опубликованными данными о контроле из той же популяции с помощью критерия Манна–Уитни. Анализ проводили с использованием пакетов статистических программ STATISTICA Advanced и GraphPad Prizm 8.0.

Результаты и обсуждение

Определение делеций AZF и частых мутаций CFTR

Первый этап исследования состоял в том, чтобы исключить из нашей выборки пациентов с известными генетическими нарушениями, которые приводят к бесплодию или ассоциированы с этой патологией по данным ряда независимых работ. Для этого нами проведен поиск делеций в локусе AZF в субрегионах AZFa, AZFb и AZFc (по 3 STS-маркера на области AZFa и AZFb, 4 – на область AZFc). Среди 49 обследованных пациентов нами не обнаружены случаи делеций AZF. При этом локализация генотипируемых STS-маркеров позволяла выявить все типы делеций этого локуса, в том числе частичные делеции AZFc [15]. С помощью этой комбинации STS-маркеров нами ранее были выявлены различные делеции AZF в гетерогенной выборке мужчин с бесплодием с частотами, соответствующими данным других авторов [14, 16].

В исследуемой когорте пациентов также проведен поиск наиболее частых мутаций CFTR, включая F508del, CFTRdel2,3 (21kb), I507del, 1677delTA, 2143delT, 2184insA, 394delTT и 5T. Обнаружен 1 гетерозиготный носитель F508del, 5 гетерозигот с аллелем 5T и 1 компаунд-гетерозигота F508del/5T. Частота носительства мутации F508del в нашей работе, равная 4,1 % (2/49), находится в пределах ее нормальных значений для восточноевропейских популяций (2–5 %) и не отличается достоверно от среднего значения в российской популяции для 1000 генотипированных здоровых добровольцев [17]. Пациент с азооспермией и генотипом F508del/5T был исключен из дальнейшей работы.

Генотипы по локусу IVS8 (T) n распределились следующим образом: 7T/7T, 69,4 % (34/49); 7T/9T, 16,3 % (8/49); 5T/7T, 8,2 % (4/49); 5T/9T, 4,1 % (2/49) и 1 случай 9T/9T. Частоты аллелей составили: 81,6 % – 7T, 12,2 % – 9T и 6,2 % – 5T.

Используя точный двусторонний критерий Фишера и критерий χ^2 мы не выявили достоверных различий частоты аллеля 5T между нашей когортой и контрольной выборкой мужчин с нормоспермией из российской популяции, опубликованной в исследовании V.B. Chernykh и соавт. [18]. Возможно, это обусловлено малым количеством пациентов в анализируемой выборке. В ретроспективном исследовании 885 мужчин с бесплодием, выполненным нами ранее, было показано достоверное увеличение частоты аллеля 5T относительно контроля [14], как и в работах других авторов по европейским популяциям [19, 20].

Определение длины CAG-повтора AR и генотипирование полиморфизмов GSTM1/GSTT1

Помимо мутаций, являющихся причиной бесплодия (делеции AZF и компаунд-гетерозиготы CFTR), нами исследованы увеличивающие риск идиопатического бесплодия полиморфные варианты генов AR, GSTM1, GSTT1.

Пациенты были генотипированы по генам GSTM1 и GSTT1 для выявления нулевых генотипов, т. е. гомозиготных делеций по исследуемым участкам генов (рис. 1а). Нулевые генотипы GSTM1 были выявлены в 40,8 % (20/49), GSTT1 – в 10,2 % (5/49), сочетанные нулевые генотипы – в 6,1 % (3/49) случаев.

В проведенном другими авторами исследовании российских пациентов показано достоверное увеличение частоты нулевых генотипов в группе 160 мужчин с бесплодием относительно 104 образцов популяционного контроля, при этом частоты делеционных генотипов у больных и в контроле соотносились как 50 % vs 37 % (GSTM1), 28 % vs 13 % (GSTT1) и 19 % vs 5 % (оба гена) [21]. Полученные нами частоты близки к таковым в контрольной группе, набранной из той же популяции цитированными здесь авторами. Тем не менее, поскольку метаанализ 6934 образцов показал ассоциацию нулевых генотипов GSTM1 и GSTT1 как по отдельности, так и вместе с олиго- и азооспермией у мужчин [8], 3 пациента в нашей выборке с сочетанными нулевыми генотипами GSTM1/GSTT1 были исключены из дальнейшей работы.

Длины CAG-повтора в экзоне 1 AR наблюдали в диапазоне 16–29 CAG-тринуклеотидов, наибольшие частоты были у аллелей 20 и 21 (CAG): 20 и 18 % соответственно. Распределение частот отличалось от нормального при проведении теста Колмогорова–Смирнова. С помощью непараметрического критерия Манна–Уитни сравнили полученное нами распределение абсолютных частот аллелей с ранее опубликованными другими авторами данными о генотипировании 200 мужчин с бесплодием из Европейской части России [22], достоверных различий частот аллелей не выявлено. Исходя из проведенного нами ранее исследования полиморфизма гена AR [23], пороговый уровень для отсека ассоциированных с идиопатическим бесплодием у мужчин условно длинных аллелей был выбран равным 26 CAG-тринуклеотидам; в диапазон неблагоприятных аллелей попал только 1 пациент (рис. 1б). В пользу выбора этого порога свидетельствуют также результаты других исследований европейских и североамериканских популяций, в которых аллели длиной более 26 (CAG) чаще встречали у пациентов с азооспермией или гипоандрогенным статусом [24, 25]. Пациент с длиной повтора 29 (CAG) был исключен из дальнейшего исследования.

Анализ метилирования гена SNRPN

После исключения 5 пациентов из выборки на основании результатов предыдущих этапов работы метилирование гена SNRPN было исследовано у 44 мужчин, из них у 12 была норма- и у 32 – олигозооспермия.

Метилирование исследовали методом МС-ПЦР с выборочным подтверждением статуса CpG-динуклеотидов в гиперметилированных аллелях с помощью секвенирования по Сэнгеру продуктов МС-ПЦР,

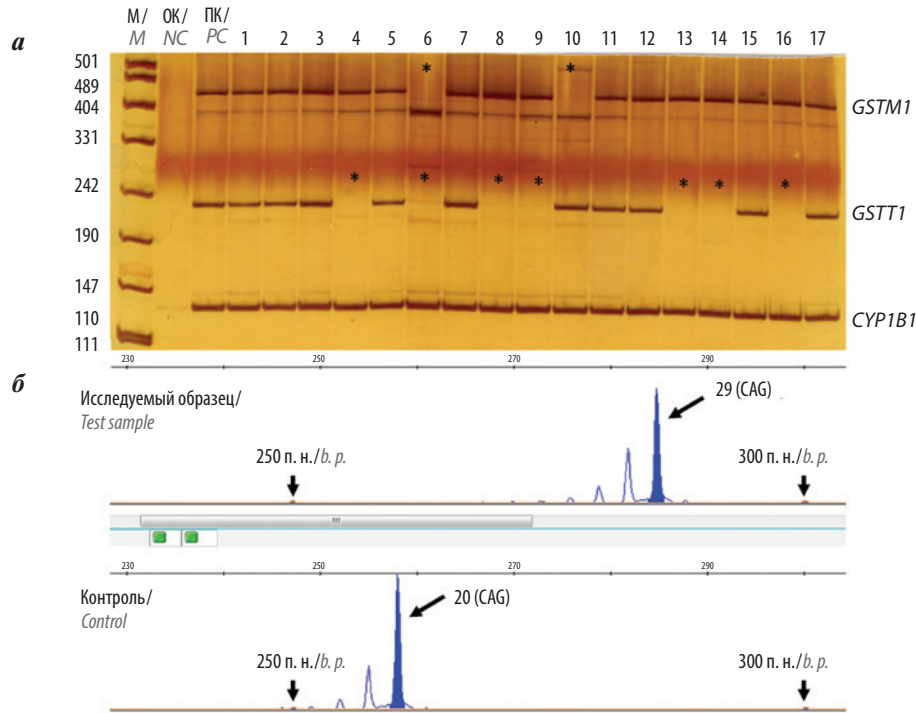


Рис. 1. Генотипирование полиморфизмов *GSTM1*, *GSTT1* и *AR*: а – электрофорез исследуемых фрагментов *GSTM1*, *GSTT1* и внутреннего контроля *CYP1B1* (указаны справа), слева – позиции маркера молекулярной массы *pUC19/MspI*; ПК и ОК – положительный и отрицательный контроль полимеразной цепной реакции соответственно; образцы с «нулевыми» генотипами *GSTM1* и *GSTT1* обозначены звездочками; б – определение длины *CAG*-повтора *AR*: вверху – тестируемый образец с длиной повтора 29 (*CAG*), внизу – положительный контроль с длиной повтора 20 (*CAG*), синим показаны аллели *CAG*-повтора, стрелками указаны позиции маркера молекулярной массы *LIZ500*

Fig. 1. Genotyping of *GSTM1*, *GSTT1*, and *AR* polymorphisms: а – electrophoresis of the studied fragments of *GSTM1*, *GSTT1*, and internal control *CYP1B1* (shown on the right), on the left – positions of the molecular weight marker *pUC19/MspI*; ПК и ОК – positive and negative control of the polymerase chain reaction, respectively; samples with «zero» genotypes *GSTM1* and *GSTT1* are indicated by asterisks; б – determination of the length of the *AR CAG* repeat: at the top – a test sample with a repeat length of 29 (*CAG*), at the bottom – a positive control with a repeat length of 20 (*CAG*), blue shows the alleles of the *CAG* repeat, arrows indicate the positions of the molecular weight marker *LIZ500*

или бисульфитного секвенирования (рис. 2). Аберрантное метилирование импринтированного гена *SNRPN* было выявлено у 5 пациентов с олигозооспермией, суммарно в 11,4 % (5/44) случаев мужского бесплодия. Частота аберрантного метилирования *SNRPN* в настоящей работе превышает аналогичный показатель в большинстве работ других авторов.

Так, анализ метилирования генов *H19*, *GNAS*, *SNRPN* и *MEG8* в образцах спермы бесплодных мужчин с помощью метода таргетного бисульфитного высокопроизводительного секвенирования (RRBS, платформа Illumina) показал наличие 1,7 % метилированных по *SNRPN* образцов в группе мужчин с олигозооспермией против 0,42 % в группе контроля с нормозооспермией, хотя указанные различия в дифференциально метилированном районе *SNRPN* в цитируемой работе были недостоверны [26]. Можно предположить, что примесь геномной ДНК лейкоцитов могла способствовать появлению ложноположительных результатов ПЦР вследствие амплификации метилированных аллелей *SNRPN* материнского происхождения в настоящей работе. Однако в процитированном выше

исследовании и в нашей работе сперматозоиды отмывали от лейкоцитов и примесей в фосфатно-солевом буфере по аналогичному протоколу. У других авторов при частоте метилирования *SNRPN* равной 3,38 % в сперматозоидах 106 мужчин с бесплодием не было выявлено ассоциации гиперметилирования с бесплодием и эффективностью применения вспомогательных репродуктивных технологий (в отличие, например, от негативной корреляции метилирования повторяющихся последовательностей с успехом экстракорпорального оплодотворения) [27, 28].

Вместе с тем, по данным ранее проведенного метаанализа 301 пациента с мужским бесплодием и 124 контрольных образцов фертильных мужчин, частота метилирования *SNRPN* в сперматозоидах составила 3,23 % у пациентов с бесплодием и была достоверно выше, чем в контроле ($p < 0,001$) [11]. В более поздних оригинальных исследованиях вновь не были обнаружены достоверные различия в частоте метилирования CpG-динуклеотидов в дифференциально метилируемом районе *SNRPN* между группами нормоспермии и олигозооспермии [29, 30]. Отчасти противоречивые данные

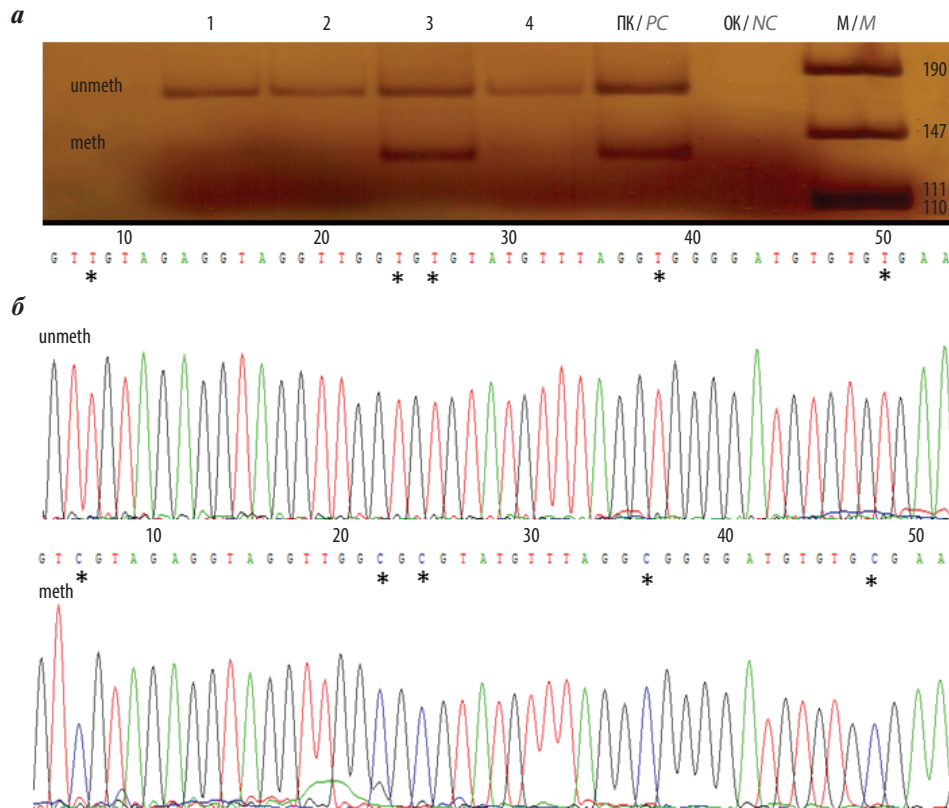


Рис. 2. Определение гиперметилирования *SNRPN*: а – метилспецифическая полимеразная цепная реакция (ПЦР) участка гена *SNRPN*. Обозначено положение неметилированного (*unmeth*) и метилированного (*meth*) аллелей, справа – позиции маркера молекулярной массы *pUC19/MspI*; ПК и ОК – положительный и отрицательный контроль ПЦР соответственно; aberrant метилирование выявлено в образце №3; б – метилспецифическое секвенирование исследуемого фрагмента *SNRPN*. Вверху – неметилированный (*unmeth*), внизу – метилированный (*meth*) аллели, дифференциально метилированные цитозины в составе CpG-динуклеотидов показаны звездочками

Fig. 2. Determination of *SNRPN* hypermethylation: а – methyl-specific polymerase chain reaction (PCR) of the *SNRPN* gene region. The position of the unmethylated (*unmeth*) and methylated (*meth*) alleles is indicated, on the right – the positions of the molecular weight marker *pUC19/MspI*; PC and NC – positive and negative PCR control, respectively; aberrant methylation was detected in sample No. 3; б – methyl-specific sequencing of the *SNRPN* fragment under study. At the top – unmethylated (*unmeth*), at the bottom – methylated (*meth*) alleles, differentially methylated cytosines in the CpG dinucleotides are shown by asterisks

о частоте метилирования *SNRPN* в сперме/сперматозоидах, помимо отличий на этапе пробоподготовки, могут быть объяснены различным дизайном праймеров для МС-ПЦР и лишь частично перекрывающимися перечнями протестированных CpG-динуклеотидов в дифференциально метилированных последовательностях этого гена.

Ближе к полученной нами частоте метилирования находится значение 7,74 % – частота гиперметилирования импринтированной последовательности *SNRPN* у курящих мужчин с бесплодием [31]. Увеличение количества метилированных аллелей в образцах спермы до 10 % при олигозооспермии наблюдали также и в другом исследовании aberrantного метилирования импринтированных генов [32].

При анализе ассоциаций метилирования *SNRPN* с мужским бесплодием следует иметь в виду, каким методом делался анализ метилированного района. МС-ПЦР одного участка может не показывать ассоциаций

с клиническими параметрами, тогда как более глубокое профилирование CpG-динуклеотидов гена *SNRPN* и прилегающих последовательностей с помощью бисульфитного секвенирования (пиросеквенирования) позволяет идентифицировать паттерны гиперметилированных цитозинов, которые различаются при норме и олигозооспермии [12].

К сожалению, малое количество образцов с метилированием *SNRPN* не позволило провести в нашей работе корреляционный анализ этого показателя со степенью олигозооспермии. Тем не менее полученные данные свидетельствуют в пользу того, что aberrantное метилирование импринтированных генов может быть вовлечено в патогенез более 11 % случаев мужского бесплодия без учета тех случаев, которые связаны с высокопенетрантными мутациями и сочетаниями неблагоприятных полиморфизмов в известных генах-кандидатах бесплодия. Для более точной оценки доли эпигенетической патологии в структуре молекулярных

нарушений сперматогенеза необходимо исследовать и другие гены (дифференциально метилированные последовательности генома) как подверженные импринтингу, так и с биаллельной экспрессией в норме.

Многие исследователи продолжают поиск дифференциально метилированных генов, которые могут быть вовлечены в патогенез олигозооспермии, в частности, показана повышенная частота метилирования генов *GAA*, *UBE2G2* и *ALS2CR12* у пациентов с олигозооспермией относительно контрольной группы ($p < 0,0001$) [33]. Выполненный в настоящей работе комплексный анализ мутаций и полиморфизмов в совокупности с оценкой частоты aberrантного метилирования *SNRPN* демонстрирует, что 20,4 % (10/49) случаев в гетерогенной выборке мужчин с бесплодием связаны со структурными генетическими нарушениями и/или эпигенетической патологией.

Заключение

Бесплодие у мужчин может быть обусловлено различными причинами, однако доля генетически обусловленных случаев постепенно увеличивается в этиоло-

гической структуре этого заболевания. Происходит это вследствие углубления знаний о молекулярном патогенезе снижения фертильности у мужчин, возросшего значения высокопроизводительного секвенирования и его роли в выявлении герминальных мутаций при синдромах Картагенера, Кальмана и другой наследственной патологии, а также изучения роли нарушений импринтинга и метилирования ДНК в сперматогенезе. В настоящей работе показано, что в 11 % случаев гетерогенной выборки мужчин с бесплодием выявлено aberrантное метилирование импринтированного гена *SNRPN* в сперме, что может отражать эпигенетические нарушения при сперматогенезе. Целесообразна валидация полученных результатов на более масштабной выборке образцов сперматозоидов с оценкой статуса метилирования других импринтированных и неимпринтированных генов. Вместе с тем нами продемонстрировано, что с учетом мутаций и полиморфизмов в уже известных связанных с бесплодием генах, около 20 % случаев снижения фертильности у мужчин характеризуются наличием молекулярно-генетических и эпигенетических нарушений.

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

1. Чалый М.Е., Ахвледиани Н.Д., Харчилава Р.Р. Мужское бесплодие. Урология 2017;2-S2:4–19. [Chaly M.E., Akhvediani N.D., Kharchilava R.R. Male infertility. Urologiya = Urology 2017;2-S2:4–19. (in Russ.)]. DOI:10.18565/urol.2017.2-supplement.4-19. PMID: 28845928.
2. Kleisch S. Diagnosis of male infertility: diagnostic work-up of the infertile man. Eur Urol Suppl 2014;13:73–82. DOI:10.1016/j.eursup.2014.08.002.
3. Krausz C., Riera-Escamilla A. Genetics of male infertility. Nat Rev Urol 2018; 15(6):369–84. DOI:10.1038/s41585-018-0003-3. PMID: 29622783.
4. Colaco S., Modi D. Genetics of the human Y chromosome and its association with male infertility. Reprod Biol Endocrinol 2018;16(1):14. DOI:10.1186/s12958-018-0330-5. PMID: 29454353.
5. Souza D.A., Fauz F.R., Pereira-Ferrari L. et al. Congenital bilateral absence of the vas deferens as an atypical form of cystic fibrosis: reproductive implications and genetic counseling. Andrology 2018;6(1):127–35. DOI:10.1111/andr.12450. PMID: 29216686.
6. Xiao F., Lan A., Lin Z. et al. Impact of CAG repeat length in the androgen receptor gene on male infertility – a meta-analysis. Reprod BioMed Online 2016;33(1):39–49. DOI:10.1016/j.rbmo.2016.03.012. PMID: 27157932.
7. Глыбочко П.В., Аляев Ю.Г., Чалый М.Е., Усачёва О.А. Влияние полиморфизма генов глутатионтрансфераз M1 и T1 на андрогенный статус и качество эякулята после оперативного лечения варикоцеле. Андрология и генитальная хирургия 2013;1:23–6. [Glybochko P.V., Alyaev Y.G., Chaly M.E., Usacheva O.A. Influence of the glutathione S-transferases T1 and M1 gene polymorphisms on androgenic status and semen quality after surgical treatment of varicocele. Andrologiya i genital'naya khirurgiya = Andrology and Genital Surgery 2013;14(1):23–6. (In Russ.)]. DOI:10.17650/2070-9781-2013-1-23-26.
8. Wu W., Lu J., Tang Q. et al. *GSTM1* and *GSTT1* null polymorphisms and male infertility risk: an updated meta-analysis encompassing 6934 subjects. Sci Rep 2013;3:2258. DOI:10.1038/srep02258. PMID: 23877133.
9. Эпигенетика. Под ред. Эллис С.Д., Дженуейн Т., Рейнберг Д., Капаррос М.Л. Пер.с англ. М.: Техносфера, 2010. 496 с. [Epigenetics. Ed. by C.D. Allis, T. Jenuwein, D. Reinberg, M.L. Caparros. M.: Technosfera, 2010. 496 pp. (in Russ.)].
10. Наследственные болезни. Национальное руководство. Под ред. Бочкова Н.П. М.: ГЭОТАР-Медиа, 2013. 936 с. [Hereditary diseases. National guideline. Ed. by N.P. Bochkov. M.: GEOTAR-Media, 2013. 936 pp. (in Russ.)].
11. Santi D., De Vincentis S., Magnani E., Spaggiari G. Impairment of sperm DNA methylation in male infertility: a meta-analytic study. Andrology 2017;5(4):695–703. DOI:10.1111/andr.12379. PMID: 28718528.
12. Peng H., Zhao P., Liu J. et al. Novel epigenomic biomarkers of male infertility identified by methylation patterns of CpG sites within imprinting control regions of H19 and SNRPN genes. OMICS 2018;22(5):354–64. DOI:10.1089/omi.2018.0019. PMID: 29708855.
13. Cheon C.K. Genetics of Prader-Willi syndrome and Prader-Will-Like syndrome. Ann Pediatr Endocrinol Metab 2016;21(3):126–35. DOI:10.6065/apem.2016.21.3.126. PMID: 27777904.
14. Михайленко Д.С., Соболев И.Ю., Сафронова Н.Ю. и др. Частота выявления делеций AZF, мутаций *CFTR* и длинных аллелей CAG-повтора *AR* при первичной лабораторной диагностике в гетерогенной группе пациентов с мужским бесплодием. Урология 2019;3:101–7. [Mikhaylenko D.S., Sobol I.Y., Safronova N.Y. et al. The incidence of AZF deletions, *CFTR* mutations and long alleles of the *AR* CAG repeats during the primary laboratory

- diagnostics in a heterogeneous group of infertile men. *Urologiya = Urology* 2019;3:101–7. (in Russ.]. DOI:10.18565/urology.2019.3.101-107. PMID: 31356021.
15. Nailwal M., Chauhan J.B. Azoospermia factor C subregion of the Y chromosome. *J Hum Reprod Sci* 2017;10(4):256–60. DOI:10.4103/jhrs.JHRS_16_17. PMID: 29430151.
 16. Аксельрод Э.В., Миронов К.О., Михайленко Д.С. и др. Разработка и апробация методики на основе мультиплексной полимеразной цепной реакции в режиме реального времени для определения клинически значимых микроделетий в Y-хромосоме. *Клиническая лабораторная диагностика* 2018;63(2):124–8. [Akselrod E.V., Mironov K.O., Mikhailenko D.S. et al. The development and approbation of methodology on the basis of multiplex polymerase chain reaction in real-time to determine clinically significant microdeletion in Y-chromosome. *Klinicheskaya laboratornaya diagnostika = Klin Lab Diagn* 2018;63(2):124–8. (in Russ.)]. DOI: 10.18821/0869-2084-2018-63-2-124-128. PMID: 30672679.
 17. Абрамов Д.Д., Кадочникова В.В., Якимова Е.Г. и др. Высокая частота носительства в российской популяции мутаций гена *CFTR*, ассоциированных с муковисцидозом, и мутаций гена *PAH*, ассоциированных с фенилкетонурией. *Вестник РГМУ* 2015;4:32–5. [Abramov D.D., Kadochnikova V.V., Yakimova E.G. et al. High carrier frequency of *CFTR* gene mutations associated with cystic fibrosis, and *PAH* gene mutations associated with phenylketonuria in Russian population. *Vestnik RGMU = Bulletin of RSMU* 2015;4:32–5. (in Russ.)].
 18. Chernykh V.B., Stepanova A.A., Beskorovainaya T.S. et al. The frequency and spectrum of mutations and the IVS8-T polymorphism of the *CFTR* gene in Russian infertile men. *Russian Journal of Genetics* 2010;46(6):750–57. PMID: 20734777.
 19. Yang X., Sun Q., Yuan P. et al. Novel mutations and polymorphisms in the *CFTR* gene associated with three subtypes of congenital absence of vas deferens. *Fertil Steril* 2015;104(5):1268–75.e2. DOI:10.1016/j.fertnstert.2015.07.1143. PMID: 26277102.
 20. Gelfi C., Perego M., Righetti P.G. et al. Rapid capillary zone electrophoresis in isoelectric histidine buffer: high resolution of the poly-T tract allelic variants in intron 8 of the *CFTR* gene. *Clin Chem* 1998;44(5):906–13. PMID: 9590360.
 21. Курашова Н.А., Беляева Е.В., Ершова О.А. и др. Ассоциация полиморфизма генов *GSTT1*, *GSTM1* с бесплодием у мужчин. *Урология* 2017;6:38–42. [Kurashova N.A., Belyaeva E.V., Ershova O.A. et al. Association of polymorphism of *GSTT1* and *GSTM1* genes with infertility in men. *Urologiya = Urology* 2017;6:38–42. (in Russ.)]. DOI:10.18565/urology.2017.6.38-42. PMID: 29376593.
 22. Черных В.Б., Руднева С.А., Сорокина Т.М. и др. Влияние CAG-полиморфизма гена андрогенового рецептора (*AR*) на сперматогенез у мужчин с бесплодием. *Андрология и генитальная хирургия* 2015;16(4):55–61. [Chernykh V.B., Rudneva S.A., Sorokina T.M. et al. An influence of androgen receptor (*AR*) gene CAG-polymorphism on spermatogenesis in infertile men. *Andrologiya i genital'naya khirurgiya = Andrology and Genital Surgery* 2015;16(4):55–61. (in Russ.)]. DOI:10.17650/2070-9781-2015-16-4-55-61.
 23. Михайленко Д.С., Бабенко О.В., Кириллова Е.А. и др. Комплексный молекулярно-генетический анализ микроделетий области AZF, мутаций гена *CFTR* и длины CAG-повтора гена *AR* у мужчин с бесплодием. *Проблемы репродукции*. 2005;11(6):52–5. [Mikhailenko D.S., Babenko O.V., Kirillova E.A. et al. Complex molecular genetic analysis of the AZF microdeletions, *CFTR* mutations, and CAG-repeat length of the *AR* gene in infertile men. *Problemy reproduktivnoy reproductivnoy*. 2005;11(6):52–5 (in Russ.)].
 24. Canale D., Caglieresi C., Moschini C. et al. Androgen receptor polymorphism (CAG repeats) and androgenicity. *Clin Endocrinol (Oxf)* 2005;63(3):356–61. DOI:10.1111/j.1365-2265.2005.02354.x. PMID: 16117826.
 25. Katagiri Y., Neri Q.V., Takeuchi T. et al. Androgen receptor CAG polymorphism (Xq11-12) status and human spermatogenesis: a prospective analysis of infertile males and their offspring conceived by intracytoplasmic sperm injection. *Int J Mol Med* 2006;18(3):405–13. PMID:16865224.
 26. He W., Sun Y., Zhang S. et al. Profiling the DNA methylation patterns of imprinted genes in abnormal semen samples by next-generation bisulfite sequencing. *J Assist Reprod Genet* 2020;37(9):2211–21. DOI:10.1007/s10815-020-01839-x. PMID: 32572674.
 27. El Hajj N., Zechner U., Schneider E. et al. Methylation status of imprinted genes and repetitive elements in sperm DNA from infertile males. *Sex Dev* 2011;5(2):60–9. DOI:10.1159/000323806. PMID: 21293114.
 28. Camprubi C., Pladevall M., Grossmann M. et al. Semen samples showing an increased rate of spermatozoa with imprinting errors have a negligible effect in the outcome of assisted reproduction techniques. *Epigenetics* 2012;7(10):1115–24. DOI:10.4161/epi.21743. PMID: 22885410.
 29. Lou H., Le F., Hu M. et al. Aberrant DNA methylation of IGF2-H19 locus in human fetus and in spermatozoa from assisted reproductive technologies. *Reprod Sci* 2019;26(7):997–1004. DOI:10.1177/1933719118802052. PMID: 30270743.
 30. Ni W., Pan C., Pan Q. et al. Methylation levels of IGF2 and KCNQ1 in spermatozoa from infertile men are associated with sperm DNA damage. *Andrologia* 2019;51(5):e13239. DOI: 10.1111/and.13239. PMID: 30680773.
 31. Dong H., Wang Y., Zou Z. et al. Abnormal methylation of imprinted genes and cigarette smoking: assessment of their association with the risk of male infertility. *Reprod Sci* 2017;24(1):114–23. DOI:10.1177/1933719116650755. PMID: 27247128.
 32. Hammoud S.S., Purwar J., Pflueger C. et al. Alterations in sperm DNA methylation patterns at imprinted loci in two classes of infertility. *Fertil Steril* 2010;94(5):1728–33. DOI:10.1016/j.fertnstert.2009.09.010. PMID: 19880108.
 33. Laqqan M., Hammadeh M.E. Alterations in DNA methylation patterns and gene expression in spermatozoa of subfertile males. *Andrologia* 2018;50(3). DOI:10.1111/and.12934. PMID: 29230837.



Вклад авторов

Д.С. Михайленко: выполнение основного объема экспериментальных исследований CAG-повтора *AR*, генов глутатионтрансфераз, MS-ПЦР гена *SNRPN*, участие в написании всех разделов статьи, формирование дизайна исследования;

О.А. Симонова: определение делеций AZF в исследуемой выборке;

И. Аль-Акел: анализ клинических данных о пациентах и участие в написании раздела о результатах и их обсуждении;

И.Ю. Соболев: сбор клинического материала и выделение ДНК;

Т.А. Едоян: участие в анализе экспериментальных данных;

Е.А. Ефремов: участие в статистическом анализе данных, написании раздела о результатах, заключения к статье и формировании дизайна исследования;

Е.Б. Кузнецова: бисульфитное секвенирование ПЦР-продуктов и выполнение отдельных экспериментальных задач работы;

М.В. Немцова: общее руководство исследованием, участие в написании раздела с обсуждением результатов.

Authors' contributions

D.S. Mikhaylenko: performing the main volume of experimental studies of the CAG repeat of *AR*, glutathione transferase genes, MS-PCR of the *SNRPN* gene, participating in the writing of all sections of the article, forming the design of the study;

O.A. Simonova: determination of AZF deletions in the study sample;

I. El Akel: analysis of clinical data on patients and participation in the writing of section on the results and discussion;

I.Yu. Sobol: collection of clinical material and isolation of DNA;

T.A. Edoyan: participation in the analysis of experimental data;

E.A. Efremov: participation in the statistical analysis of data, writing a section on the results, conclusion to the article and forming the design of the study;

E.B. Kuznetsova: bisulfite sequencing of PCR products and implementation of individual experimental tasks;

M.V. Nemtsova: general management of the study, participation in the writing of the section with the discussion of the results.

ORCID авторов / ORCID of authors

Д.С. Михайленко / D.S. Mikhaylenko: <https://orcid.org/0000-0001-9780-8708>

Е.А. Ефремов / E.A. Efremov: <https://orcid.org/0000-0001-7193-7413>

Е.Б. Кузнецова / E.B. Kuznetsova: <https://orcid.org/0000-0002-7857-6320>

М.В. Немцова / M.V. Nemtsova: <https://orcid.org/0000-0002-2835-5992>

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Conflict of interest. The authors declare no conflict of interest.

Финансирование. Работа выполнена при частичной финансовой поддержке государственного задания Минобрнауки России на 2020 г.

Financing. The work was carried out with partial financial support of the state task of the Ministry of Education and Science of Russia for 2020.

Соблюдение прав пациентов и правил биоэтики. Все пациенты подписали информированное согласие на участие в исследовании. Работа одобрена локальным этическим комитетом ФГАОУ ВО Первый МГМУ им. И.М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский Университет).

Compliance with patient rights and principles of bioethics. All patients signed informed consent to participate in the study. The work was approved by the Local Ethics Committee of the I.M. Sechenov First MSMU MOH Russia (Sechenov University).