

© ^{1,2}Жилкова Е. С., ¹Сотник Н. Н., ¹Феськов А. М., ²Федота А. М.

УДК 577.21:577.218

^{1,2}Жилкова Е. С., ¹Сотник Н. Н., ¹Феськов А. М., ²Федота А. М.

АНАЛИЗ ПОЛИМОРФНЫХ ВАРИАНТОВ ГЕНОВ *MTHFR* (C677T, A1298C) И *MTRR* (A66G) У МУЖЧИН СО СНИЖЕННОЙ РЕПРОДУКТИВНОЙ ФУНКЦИЕЙ

¹ Центр репродукции человека

«Клиника профессора Феськова А. М.» (г. Харьков)

² Харьковский национальный университет имени В. Н. Каразина (г. Харьков)

zhilkova@feskov.com.ua

afedota@mail.ru

Данная работа является фрагментом НИР «Особливості лікування і профілактики патологічних станів у прегравідарний період і в період гестації та шляхи їх корекції».

Вступление. В настоящее время нарушениям отцовского генома уделяется все большее внимание в репродуктивной медицине. Проблема целостности генома мужских гамет актуальна для диагностики и лечения мужского бесплодия, повышения эффективности методов вспомогательных репродуктивных технологий (ВРТ) и предотвращения передачи генетических дефектов при использовании ВРТ, особенно при инъекции сперматозоида в яйцеклетку (ИКСИ) [6,7]. Отцовский эффект может быть связан с такими генетическими факторами, как генные мутации, микроделеции, анеуплоидии, эпигенетические нарушения, повреждения ДНК и нарушения компактизации хроматина [2,12,13].

Одной из возможных причин снижения фертильности у мужчин, по мнению ряда авторов, является нарушение компактизации хроматина в ядрах сперматозоидов, или фрагментация ДНК [20,31,32]. Разрывы ДНК, выявляемые в эякуляторных сперматозоидах, могут являться следствием нарушения их созревания в процессе сперматогенеза. Нарушение процесса сперматогенеза на разных его стадиях может привести не только к нарушению целостности ДНК, но и к появлению хромосомных отклонений в ядрах сперматозоидов. Согласно литературным данным, наиболее хорошо изучен уровень анеуплоидий в сперме для хромосом 15, 18, 19, 21, X и Y. Наиболее часто в сперме наблюдаются анеуплоидии по хромосомам 18, X и Y [14,18,23,24,26,29]. Обнаружение у пациента высокого содержания анеуплоидных сперматозоидов является показанием для проведения преимплантационной генетической диагностики (ПГД) с целью выбора эуплоидного эмбриона [22,34].

Известно, что полиморфные варианты отдельных генов, контролирующих этапы сперматогенеза и метаболизма организма, могут быть ассоциированы с нарушением подвижности, морфологическими и фертильными свойствами сперматозоидов, которые проявляются в диапазоне от легкого нарушения сперматогенеза до полного отсутствия половых клеток в семенных канальцах (синдром

«только клеток Сертоли»). В качестве одной из возможных причин нарушения формирования зрелых мужских половых клеток в литературе обсуждается снижение функциональной активности ферментов фолатного обмена [15,28,35].

Дефицит фолиевой кислоты и гипометилирование ДНК, ассоциированные с высокой частотой полиморфных аллелей генов *MTHFR* и *MTRR*, могут быть причиной нерасхождения хромосом. Об этом свидетельствуют и представленные в литературе данные об ассоциации гомозиготных генотипов по полиморфным аллелям генов фолатного обмена с повышенным риском развития канцерогенеза (колоректальной аденокарциномы, рака молочной железы и яичника); сердечно-сосудистых заболеваний (ишемической болезни сердца – ИБС, инфаркта миокарда, атеросклероза, атеротромбоза); осложненных беременностей (фетоплацентарной недостаточности, преждевременной отслойки нормально расположенной плаценты, позднего гестоза); дефектов развития плода (незаращения нервной трубки, анэнцефалии, деформаций лицевого скелета), рождения детей с хромосомной патологией [10,11,15,19,21,26,30].

Целью работы стало исследование связи полиморфных вариантов генов фолатного обмена – C677T (Ala222Val), A1298C (Glu429Ala) гена *MTHFR* и A66G (Ile22Met) гена *MTRR* с показателями качества спермы у мужчин со сниженной репродуктивной функцией.

Объект и методы исследования. Сбор первичной информации и лабораторные исследования проводились в Центре репродукции человека «Клиника профессора Феськова А. М.» (г. Харьков).

Материалом для молекулярно-генетического исследования послужили образцы периферической крови 136 мужчин со сниженной репродуктивной функцией, средний возраст которых составил $37,3 \pm 5,9$ лет. В ходе работы пациенты были разделены на 2 группы. В группу I вошли 112 мужчин, для которых проведено определение степени фрагментации ДНК сперматозоидов в эякуляте. Группу II составили 24 мужчины, у которых определялся уровень анеуплоидных сперматозоидов в эякуляте. Средний возраст мужчин первой группы составил $37,0 \pm 6,1$ лет, второй группы – $38,6 \pm 5,1$ лет.

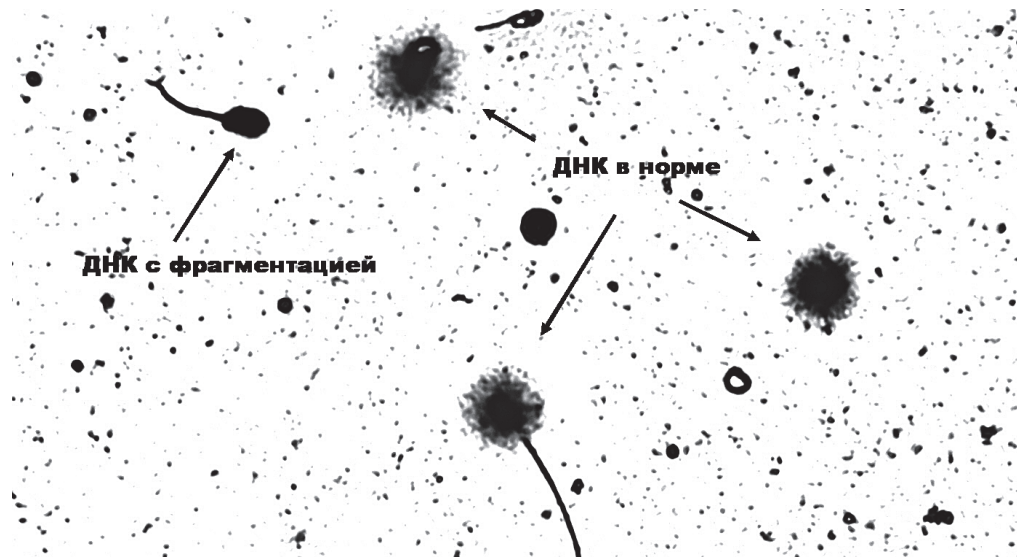


Рис. 1. Анализ фрагментации ДНК сперматозоидов методом SCD (sperm chromatin dispersion)

Выделение ДНК проводилось с помощью наборов для экстракции ДНК «NucleoSpin Blood» (Германия). RT-PCR выполнена с использованием системы «ABI PRISM 7500 real-time PCR system» (США) и наборов для определения однонуклеотидных замен в генах *MTRR* и *MTHFR* по стандартной методике производителя [5]. В качестве данных о контроле использовались представленные в отечественной литературе результаты генетического тестирования выборок из украинского населения [8,9,33].

Анализ фрагментации ДНК сперматозоидов проводился методом SCD («HaloSperm», «Halotech», Испания). Результат документирован с помощью программы «Lucia FISH» («LIM», Чехия).

Для выявления анеуплоидий в ядрах сперматозоидов по хромосомам 13, 16, 18, 21, X, Y был применен метод флуоресцентной гибридизации in situ (fluorescence hybridization in situ, FISH). Для флуоресцентной гибридизации были применены следующие ДНК-зонды: CEP Y (DYZ3) Satellite DNA SpectrumOrange, CEP X (DXZ1) Alpha Satellite DNA SpectrumGreen, LSI 13 (13q14) SpectrumGreen, CEP 16(D16Z3) Satellite II DNA SpectrumGreen, CEP 18(D18Z1) Alpha Satellite DNA SpectrumAqua, LSI 21 (loci D21S259, D21S341, D21S342, region 21q22.13-q22.2) SpectrumOrange (Vysis-Abbott, США).

Для всех мужчин было проведено кариотипирование. Для проведения цитогенетических исследований препараты хромосом получали из лимфоцитов периферической крови по стандартной методике GTG-методом. Результаты цитогенетического исследования приведены согласно Международной системе номенклатуры цитогенетики человека [27].

Полученные данные проверены на соответствие закону нормального распределения. Для выявления связи между полиморфными вариантами генов *MTRR* и *MTHFR* и содержанием анеуплоидных сперматозоидов и уровнем фрагментации ДНК в сперме проведен корреляционный анализ по Спирмену. Для сравнения количественных характеристик разных групп обследованных использован критерий

Манна-Уитни. При множественных сравнениях вводилась поправка Бонферрони. Проверка статистических гипотез об ассоциации изученных аллелей и генотипов с исследуемыми признаками и оценка равенства рядов распределения выполнена с помощью критерия χ^2 [1].

Результаты исследований и их обсуждение.

Нормальный кариотип, 46,XY, установлен у всех обследованных мужчин. Показатели уровня фрагментации ДНК мужчин группы I составили от 1,5% до 75,0%. Согласно рекомендациям Европейской Ассоциации Урологов, содержание сперматозоидов в эякуляте, содержащих фрагментированную ДНК, в норме не должно было превышать 20,0% [16]. Фото сперматозоидов, несущих фрагментированную ДНК, представлено на **рисунке 1**. Уровень анеуплоидии в сперме мужчин группы II лежит в пределах от 0,2% до 4,3%. В норме содержание анеуплоидных сперматозоидов в эякуляте не должно превышать 1,3% [17]. Ядро анеуплоидного по половым хромосомам сперматозоида представлено на **рисунке 2**.

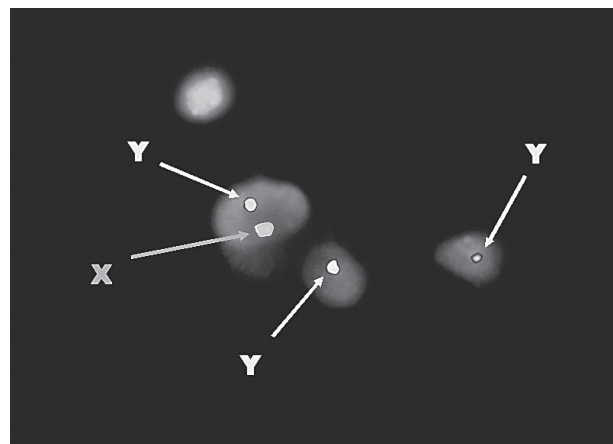


Рис. 2. Ядро анеуплоидного сперматозоида: красный сигнал – хромосомы Y, зеленый сигнал – хромосома X.

Таблица 1.
Распределение аллелей по полиморфным вариантам C677T и A1298C гена MTHFR и A66G гена MTRR у мужчин со сниженной фертильностью

Ген	SNP	Частоты аллелей	
		P	q
MTHFR	C677T	P _C	q _T
	- группа I	0,71	0,29
	- группа II	0,71	0,29
	- общая группа	0,71	0,29
	A1298C	P _A	q _C
	- группа I	0,95	0,05
- группа II	0,71	0,29	
- общая группа	0,91	0,09	
MTRR	A66G	P _A	q _G
	- группа I	0,79	0,21
	- группа II	0,42	0,58
	- общая группа	0,72	0,28

Для мужчин всех групп рассчитаны частоты аллелей и генотипов исследуемых полиморфных вариантов генов *MTRR* и *MTHFR* (табл. 1).

При исследовании однонуклеотидного полиморфизма C677T гена *MTHFR* частоты аллелей составили: P_C = 0,71 и q_T = 0,29 во всех группах мужчин. Полученные частоты сходны с частотами, полученными для населения Харьковской области и приведенными авторами ранее – p_C = 0,721, q_T = 0,279 [8].

Частоты аллелей по полиморфному варианту A1298C гена *MTHFR* составили для мужчин общей группы – P_A = 0,91 и q_C = 0,09; группы I – P_A = 0,95 и q_C = 0,05, группы II – P_A = 0,71 и q_C = 0,29 соответственно. Выявленные нами частоты аллелей сопоставимы с приведенными данными для украинского населения других авторов – P_A = 0,65 и q_C = 0,35, соответственно [9].

По полиморфному варианту A66G гена *MTRR* частоты аллелей составили: для общей группы P_A = 0,72 и q_G = 0,28, для группы I – P_A = 0,79 и q_G = 0,21, для группы II – P_A = 0,42 и q_G = 0,58 соответственно. Полученные частоты аллелей так же сходны с данными других авторов – p_A = 0,44, q_G = 0,56 [9].

Группы мужчин с повышенным уровнем фрагментации ДНК сперматозоидов (группа I) и повышенным уровнем анеуплоидии (группа II) по частотам аллелей проанализированных генов значимо не отличаются друг от друга.

Распределение генотипов по полиморфным вариантам генов *MTHFR* и *MTRR* у обследованных мужчин представлено в таблице 2.

Частоты генотипов для полиморфного варианта C677T гена *MTHFR* среди больных мужчин в целом составили 52,2%, 36,8% и 11,0%. Полученные данные сопоставимы с приведенными ранее нами и другими авторами частотами генотипов по полиморфному варианту C677T гена *MTHFR* для украинского населения: 54,0%, 41,0% и 5,0%; 54,7%, 34,7% и 10,5%; и 50,0%, 42,0%, 8,0 соответственно [8,9,33]. Статистически значимой раз-

ницы между частотами генотипов пациентов каждой из групп и данными по украинскому населению не выявлено [8].

Полученные нами частоты генотипов по полиморфному варианту A1298C гена *MTHFR* для больных с нарушениями степени фрагментации ДНК сперматозоидов (группа I) значимо отличаются от распределения частот среди украинского населения: 89,3%, 10,7% и 0,0% против 43,0%, 45,0% и 12,0% (df = 2, $\chi^2_{\text{факт.}} = 49,33$, $\chi^2_{\text{крит.}} = 9,21$, p < 0,01) [9]. Среди мужчин этой группы гомозигот по аллелю дикого типа в два раза больше, гетерозигот – в четыре раза меньше.

Анализ частот генотипов по полиморфному варианту A66G гена *MTRR* показал, что для пациентов с нарушениями степени фрагментации ДНК сперматозоидов (группа I) так же установлены значимые отличия по частотам генотипов от данных по украинскому населению: 68,8%, 19,6%, 11,6% против 26,0%, 37,0% и 37,0% (df = 2, $\chi^2_{\text{факт.}} = 37,95$, $\chi^2_{\text{крит.}} = 9,21$, p < 0,01). Среди пациентов этой группы гомозигот по аллелю дикого типа в два раза больше, гетерозигот – в два раза меньше [9].

В то же время для мужчин с повышенным уровнем анеуплоидий спермы (группа II) и всех мужчин в целом статистически значимых отличий от литературных данных о частотах генотипов полиморфных вариантов A1298C гена *MTHFR* и A66G гена *MTRR* нами не выявлено.

Установлена статистически значимая разница между группами I и II по частотам генотипов по полиморфному варианту A1298C гена *MTHFR* (df = 2, $\chi^2_{\text{факт.}} = 24,74$, $\chi^2_{\text{крит.}} = 9,21$, p < 0,01) и A66G гена *MTRR* (df = 2, $\chi^2_{\text{факт.}} = 22,33$, $\chi^2_{\text{крит.}} = 9,21$, p < 0,01), соответственно. У пациентов с высоким содержанием

Таблица 2.
Распределение генотипов по полиморфным вариантам C677T и A1298C гена MTHFR и A66G гена MTRR у мужчин со сниженной фертильностью

Ген	SNP	Генотип		
		Гомозиготный по аллелю дикого типа	Гетерозиготный	Гомозиготный по полиморфному аллелю
		N (%)	N (%)	N (%)
MTHFR	C677T	CC	CT	TT
	- группа I	59 (52,7)	40 (35,7)	13 (11,6)
	- группа II	12 (50,0)	10 (41,7)	2 (8,3)
	- общая группа	71 (52,2)	50 (36,8)	15 (11,0)
	A1298C	AA	AC	CC
	- группа I	100 (89,3)	12 (10,7)	0 (0,0)
- группа II	12 (50,0)	10 (41,7)	2 (8,3)	
- общая группа	112 (82,4)	22 (16,2)	2 (1,4)	
MTRR	A66G	AA	AG	GG
	- группа I	77 (68,8)	22 (19,6)	13 (11,6)
	- группа II	4 (16,7)	12 (50,0)	8 (33,3)
	- общая группа	81 (59,6)	34 (25,0)	21 (15,4)

анеуплоидных сперматозоидов в эякуляте (группа II) частоты генотипов с полиморфными аллелями AC и CC составили 41,7% и 8,3%, AG и GG – 50,0% и 33,3%, тогда как у пациентов с нарушением фрагментации ДНК сперматозоидов (группа I) – 10,7% и 0,0%, 19,6% и 11,1%, в 2-4 раза меньше, соответственно.

Известно, что при наличии генотипов, обуславливающих изменения фолатного обмена, нарушается нормальное расхождение хромосом в гаметогенезе. Так, по данным С. А. Hobbs (2000), полиморфный аллель Т гена *MTHFR* в два раза чаще встречается у матерей детей с синдромом Дауна, чем среди женщин контрольной группы. При генотипе G/G по гену *MTRR* у матери вероятность рождения ребенка с синдромом Дауна увеличивается в 2,5 раза. При комбинации 2-х указанных выше генотипов риск возникновения синдрома Дауна у плода повышается в 4 раза [19].

Вероятно, такой же эффект имеет место и при сперматогенезе, вследствие чего у мужчин с высоким содержанием анеуплоидных сперматозоидов в эякуляте частоты генотипов с полиморфными аллелями генов фолатного обмена оказываются в 2-4 раза выше, чем у мужчин с нарушениями фрагментации ДНК. Нами проанализирована связь степени фрагментации ДНК сперматозоидов с коли-

чеством полиморфных аллелей по исследованным генам у мужчин группы I, и значимой корреляции не установлено ($r_s = 0,108$, $R_{кр} = 0,2$, $p > 0,05$). Нарушения фрагментации ДНК сперматозоидов, вероятно, в большей степени связаны с полиморфными вариантами других генов, контролирующих различные этапы сперматогенеза, например, с геном рецептора к фолликулостимулирующему гормону [4].

Выводы. Исследование показало, что у мужчин с высоким содержанием анеуплоидных сперматозоидов в эякуляте частоты генотипов с полиморфными аллелями генов фолатного обмена в 2-4 раза выше, чем у мужчин с нарушениями фрагментации ДНК, что согласуется с данными литературы о нарушениях нормального расхождения хромосом в оогенезе при наличии генотипов, обуславливающих изменения фолатного обмена.

Перспективы дальнейших исследований. Известно, что анеуплоидные сперматозоиды и сперматозоиды с нарушением целостности ДНК сохраняют способность оплодотворять ооциты, но дальнейшее формирование бластоцист и имплантация эмбрионов могут быть заблокированы на разных этапах развития. Понимание генетических основ анеуплоидии в сперме у мужчин позволит снизить репродуктивные потери при проведении программ экстракорпорального оплодотворения [3].

Литература

1. Атраментова Л. О. Статистичні методи в біології [Текст]: підруч. для студентів біолог. спец. вищих навч. закладів / Л. О. Атраментова, О. М. Утевська. – Харьков: [б. в.], 2007. – 286 с. – Б. ц.
2. Долгов В. В. Лабораторная диагностика мужского бесплодия / В. В. Долгов, С. А. Луговская, Н. Д. Фанченко. – М.: Триада, 2006. – 145 с.
3. Долгушина Н. В. Риск анеуплоидии эмбрионов в программах вспомогательных репродуктивных технологий у мужчин с патозооспермией (мета-анализ) / Н. В. Долгушина, С. С. Ратушняк, С. А. Сокур, Ж. И. Глинкина, Е. А. Калинина // Акушерство и гинекология. – 2012. – № 7. – С. 4–13
4. Жилкова Е. С. Анализ полиморфных вариантов G919A и A2039G гена FSHR у мужчин со сниженной фертильностью в восточно-украинской популяции / Е. С. Жилкова, А. М. Феськов, А. М. Федота, Е. В. Блажко // Вестник проблем биологии и медицины. – 2015. – Т. 1, № 124. – с. 182-187.
5. Колупаев Е. В. Преимущества ПЦР в реальном времени (Real Time PCR) / Е. В. Колупаев // Лабораторная медицина. – 2002. – № 5. – с. 110-112.
6. Кулаков В. И. Экстракорпоральное оплодотворение и его новые направления в лечении женского и мужского бесплодия (теоретические и практические подходы): Руководство для врачей / В. И. Кулаков, Б. В. Леонов. – 2-е изд., доп. – М.: Медицинское информационное агентство, 2004. – 782 с.
7. Курило Л. Ф. Структура наследственных нарушений репродуктивной системы / Л. Ф. Курило, Л. В. Шилейко, Т. М. Сорокина, Е. М. Гришина // Вест РАМН. – 2000. – № 5. – с. 32–36.
8. Федота А. М. Структура населения Харьковской области по полиморфизму С 677Т гена MTHFR [Текст] / А. М. Федота, А. С. Солодянкин, Е. А. Солодянкина, И. Н. Меренкова // Актуальні проблеми акушерства і гінекології, клін. імунології та мед. генетики. – 2011. – Вип. 22. – С. 332–342.
9. Чорна Л. Б. Аналіз поліморфних варіантів генів MTHFR, MTR, MTRR та мутацій генів FV та FII згортання крові серед жінок з навичковим невиношуванням вагітності / Л. Б. Чорна, Г. В. Макух, Г. Р. Акоюн, Д. В. Заставна, Н. М. Прокопчук // Вісник Харківського національного університету імені В. Н. Каразіна. Серія: біологія. – 2011. – Вип. 13, № 947.
10. Altomare I. The 5, 10 methylenetetrahydrofolate reductase C677T mutation and risk of fetal loss: a case series and review of the literature / I. Altomare, A. Adler, L. M. Aledort // Thromb J. – 2007. – Vol. 5, № 17. doi: 10.1186/1477-9560-5-17
11. Ambreen A. Folate Metabolism and Genetic Variant in Down Syndrome: A Meta- Analysis / A. Ambreen, S. Agarwal, S. S. Sakil, I. Kulkarni Panigrahi // J Genet Syndr Gene Ther. – 2015. – Vol 6, № 3 http://dx.doi.org/10.4172/2157-7412.1000270
12. Brahem S. Detection of DNA fragmentation and meiotic segregation in human with isolated Teratozoospermia / S. Brahem, M. Mehdi, H. Elghezal, A. Saad // J Assist Reprod Genet. – 2011. – № 28. – P. 41-48.
13. Calogero A. E. Sperm aneuploidy in infertile men / A. E. Calogero, N. Burrello, A. De Palma, N. Barone, R. D'Agata, E. Vicari // Reprod Biomed Online. – 2003. – Vol. 6, № 3. –P. 310-317.
14. Collodel G. Sperm aneuploidies and low progressive motility / G. Collodel, S. Capitani, A. Baccetti, E. Pammoll, E. Moretti // Hum Reprod. – 2007. – Vol. 22, № 7. – P.1893-1898.
15. Daval J. L. Impact of folate and homocysteine metabolism on human reproductive health / J. L. Daval, J. L. Guerant, T. Forges, P. Monnier-Barbarino, J. M. Alberto, R. M. Guerant-Rodriguez // Human Reproduction. – 2007. –Vol. 13, № 3. – P. 225-238.
16. Dohle G. R. Мужское бесплодие (научное редактирование: Акоюн А.С.) / G. R. Dohle, T. Diemer, A. Giwercm, A. Jungwirth, Z. Kopa, C. Krausz. – Европейская ассоциация урологов. – 2010. – 67 с.

17. Dohle G. R. European Association of Urology Working Group on Male Infertility [Електронний ресурс] / G. R. Dohle, T. Diemer, Z. Kopa. – Eur Urol, 2014. – Режим доступа: http://uroweb.org/wp-content/uploads/17-Male Infertility_LR.pdf.
18. El-Sayed A. Mohamed. Sperm Aneuploidy and Male Fertility / A. El-Sayed Mohamed, Myung-Geol Pang // Aneuploidy: Etiology, Disorders and Risk Factors. – 2012. – Chapter IX. – P. 144-159.
19. Hobbs C. A. Polymorphisms in genes involved in folate metabolism as maternal risk factors for Down syndrome / C. A. Hobbs, S. L. Sherman, P. Yi, S. E. Hopkins, C. Torfs, R. J. Hine, M. Pogribn, R. Rozen, S. J. James // Am. J. Hum. Genet. – 2000. – № 67. – P.623-630.
20. Hofherr S. E. Clinical diagnostic testing for the cytogenetic and molecular causes of male infertility: the Mayo Clinic experience / S. E. Hofherr, A. E. Wiktor, B. R. Kipp, B. P. Dawson, D. L. Van Dyke // J Assist Reprod Genet. – 2011. – Vol. 28, № 11. – P. 1091-1098.
21. Kelly Cristina de Oliveira. Prevalence of the polymorphism MTHFR A1298C and not MTHFR C677T is related to chromosomal aneuploidy in Brazilian Turner Syndrome patients / K. C. de Oliveira, B. Bianco, T. N. Ieda, D. G. Alexis, B. G. Bianca, F. G. Marcial, P. B. Caio, M. N. Lipay // Arq Bras Endocrinol Metab. – 2008. – Vol.52, № 8, <http://dx.doi.org/10.1590/S0004-27302008000800028>.
22. Magli M. C. Paternal contribution to aneuploidy in preimplantation embryos / M. C. Magli, L. Gianaroli, A. P. Ferraretti, S. Gordts, V. Fredericks, A. Crippa // Reprod Biomed Online. – 2009. – Vol. 18, № 4. – P.536-542.
23. Mehdi M. Analysis by fluorescence in situ hybridization (FISH) of the relationship between gonosomal aneuploidy and the results of assisted reproduction in men with severe oligozoospermia / M. Mehdi, B. Smatti, A. Saad, J. F. Guerin, M. Benchaib // Andrologia. – 2006. – Vol. 38, № 4. – P.137-141.
24. Mehdi M. Aneuploidy rate in spermatozoa of selected men with severe Teratozoospermia / M. Mehdi, A. Gmidene, S. Brahem, J. Guerin, H. Elghezal, A. Saad // Andrologia. – 2012. – Vol. 44, Suppl. 1. – P.139-143.
25. Rai V. Polymorphism in Folate Metabolic Pathway Gene as Maternal Risk Factor for Down Syndrome / V. Rai // Int J Biol Med Res. – 2011. – Vol. 2, № 4. – P. 1055-1060.
26. Ramasamy R. Fluorescence in situ hybridization detects increased sperm aneuploidy in men with recurrent pregnancy loss / R. Ramasamy, J. M. Scovell, J. R. Kovac, P. J. Cook, D. J. Lamb, L. I. Lipshultz // Fertility and Sterility. – 2015. – Vol. 103, № 4. – P.906-909.e1
27. Shaffer L. G. ISCN 2009 An International System for Human Cytogenetic Nomenclature / L. G. Shaffer, M. L. Slovak, L. J. Campbell. – S: Karger, 2009. – 138 p.
28. Shen O. Association of the methylenetetrahydrofolate reductase gene A1298C polymorphism with male infertility: a meta-analysis / O. Shen, R. Liu, W. Wu, L. Yu, X. Wang // Ann Hum Genet. – 2012. – Vol. 76, № 1. – P. 25-32.
29. Shi Q. Aneuploidy in human spermatozoa: FISH analysis in men with constitutional chromosomal abnormalities, and in infertile men / Q. Shi, R. H. Martin // Reproduction. – 2001. – Vol. 121, № 5. – P. 655-666.
30. Shiny V. Evidence of Paternal N5, N10 – Methylenetetrahydrofolate Reductase (MTHFR) C677T Gene Polymorphism in Couples with Recurrent Spontaneous Abortions (RSAs) in Kolar District- A South West of India / V. Shiny, C. D. Dayanand, F. K. Pushpa, A. K. Moideen, Pradeep V. Kumar // J Clin Diagn Res. – 2015. – Vol. 9, № 2. – P. BC15-BC18.
31. Simon L. Clinical significance of sperm DNA damage in assisted reproduction outcome / L. Simon, G. Brunborg, M. Stevenson, D. Lutton, J. McManus, S. E. Lewis // Hum Reprod. – 2010. – Vol. 25, № 7. – P. 1594-1608.
32. Speyer B. E. Fall in implantation rates following ICSI with sperm with high DNA fragmentation / B. E. Speyer, A. R. Pizzey, M. Ranieri, R. Joshi, J. D. A. Delhanty, P. Serhal // Hum Reprod. – 2012. – Vol. 25, № 7. – P. 1609-1618.
33. Tatarsky P. Allelic polymorphism of F2, F5 and MTHFR genes in population of Ukraine / P. Tatarsky, A. Kucherenko, L. Livshits // Tsitol. Genet. – 2010. – V. 44. – P. 3-8.
34. Tempest H. G. The relationship between male infertility and increased levels of sperm Disomy / H. G. Tempest, D. K. Griffin // Cytogenet Genome Res. – 2004. – Vol. 107, № 1-2. – P. 83-94.
35. Wei B. MTHFR 677C>T and 1298A>C polymorphisms and male infertility risk: a meta-analysis / B. Wei, Z. Xu, J. Ruan, M. Zhu, K. Jin, D. Zhou, Z. Xu, Q. Hu, Q. Wang, Z. Wang // Mol Biol Rep. – 2012. – Vol. 39, № 2. – P. 1997-2002.

УДК 577.21:577.218

АНАЛІЗ ПОЛІМОРФНИХ ВАРІАНТІВ ГЕНІВ *MTHFR* (C677T, A1298C) ТА *MTRR* (A66G) У ЧОЛОВІКІВ ЗІ ЗНИЖЕНОЮ РЕПРОДУКТИВНОЮ ФУНКЦІЄЮ

Жилкова Є. С., Сотник Н. М., Феськов О. М., Федота О. М.

Резюме. Досліджено зв'язок поліморфних варіантів генів фолатного обміну C677T (Ala222Val), A1298C (Glu429Ala) гену *MTHFR* і A66G (Ile22Met) гену *MTRR* з показниками якості сперми у чоловіків зі зниженою репродуктивною функцією. Встановлено, що у чоловіків з високим вмістом анеуплоїдних сперматозоїдів в еякуляті частоти генотипів з поліморфними алелями генів фолатного обміну у 2-4 рази вищі, ніж у чоловіків з порушеннями фрагментації ДНК, що узгоджується з даними літератури про порушення нормального розходження хромосом в оогенезі за наявності генотипів, що обумовлюють зміни фолатного обміну.

Ключові слова: фрагментація ДНК, анеуплоїдія, *MTHFR*, *MTRR*, репродуктивна функція.

УДК 577.21:577.218

АНАЛИЗ ПОЛИМОРФНЫХ ВАРИАНТОВ ГЕНОВ *MTHFR* (C677T, A1298C) И *MTRR* (A66G) У МУЖЧИН СО СНИЖЕННОЙ РЕПРОДУКТИВНОЙ ФУНКЦИЕЙ

Жилкова Е. С., Сотник Н. Н., Феськов А. М., Федота А. М.

Резюме. Исследована связь полиморфных вариантов генов фолатного обмена – C677T (Ala222Val), A1298C (Glu429Ala) гена *MTHFR* и A66G (Ile22Met) гена *MTRR* с показателями качества спермы у мужчин со сниженной репродуктивной функцией. Установлено, что у мужчин с высоким содержанием анеуплоидных сперматозоидов в эякуляте частоты генотипов с полиморфными алелями генов фолатного обмена в 2-4 раза выше, чем у мужчин с нарушениями фрагментации ДНК, что согласуется с данными литературы

о нарушениях нормального расхождения хромосом в оогенезе при наличии генотипов, обуславливающих изменения фолатного обмена.

Ключевые слова: фрагментация ДНК, анеуплоидия, *MTHFR*, *MTRR*, репродуктивная функция.

UDC 577.21:577.218

ANALYSIS OF POLYMORPHIC VARIANTS OF GENES *MTHFR* (C677T, A1298C) AND *MTRR* (A66G) IN MEN WITH LOW REPRODUCTIVE FUNCTION

Zhylova I., Sotnik N., Feskov O., Fedota O.

Abstract. Infertility is estimated to affect 10–15% of couples, and roughly half of these cases are due to the male factor. Spermatogenic failure is the most common form of male infertility; however, in most cases the etiology remains unknown. Genetic abnormalities are thought to account for 15%–30% of male factor infertility and these can include Y chromosome microdeletions, chromosomal aberrations and rare single-gene defects. Deleterious gene polymorphisms in key genes involved in testicular function, in combination with environmental insults, may be responsible for the reduced sperm numbers and poor sperm quality that are observed in many infertile men.

A possible candidate for genetic susceptibility to spermatogenic failure is the gene 5,10-Methylenetetrahydrofolate reductase (*MTHFR*). *MTHFR* is an important regulatory enzyme in folate and homocysteine metabolism, which is necessary for a number of key biological cellular mechanisms. This regulatory enzyme catalyzes the reduction of 5,10-methylenetetrahydrofolate to produce 5-methyltetrahydrofolate, which is the methyl donor for the remethylation of homocysteine to methionine. Subsequently, methionine provides the methyl group for the formation of S-adenosylmethionine, the methyl donor for DNA methylation. Methylation anomalies of sperm DNA has been linked to male infertility. Reduced enzymatic activity due to *MTHFR* polymorphisms is associated with hyperhomocysteinemia that is considered as a risk factor for many diseases, including infertility. Moreover, the activity of *MTHFR* is much higher in testis than in other major organs in the adult mouse, suggesting that it might play an important role in testicular function. Two single nucleotide polymorphisms (SNPs) in the *MTHFR* gene, C677T (A→V) and A1298C (E→A), are individually associated with a reduction in the biochemical activity of the enzyme. The *MTHFR* C677T variant decreases *MTHFR* activity and increases the homocysteine level. Similarly the *MTHFR* A1298C variant also reduces enzyme activity but to a lesser degree than C677T. Some studies have shown a significant statistical correlation between *MTHFR* polymorphisms and human male infertility, whereas others did not find any such association.

The aim of present study was to analyze the association of polymorphic variants of genes *MTHFR* (C677T, A1298C) and *MTRR* (A66G) with sperm quality in men with low reproductive function. It is found out that the frequencies of genotypes with polymorphic alleles of genes of folic exchange process is in 2-4 times higher in men with high level of the sperm aneuploidies in ejaculate comparing with patients with chromatin compactization (DNA fragmentation) failures in spermatozoa.

Keywords: DNA fragmentation, aneuploidy, *MTHFR*, *MTRR*, reproductive function.

Рецензент – проф. Кочина М. Л.
Стаття надійшла 23.10.2015 року