

IVS8(N)-T ВАРИАНТА В CFTR ГЕНА КАТО ФАКТОР ЗА НАРУШЕНА СПЕРМАТОГЕНЕЗА

Мария Левкова^{1,2}, Трифон Червенков^{1,3}, Мари Хачмериян^{1,2}, Людмила Ангелова¹

¹Катедра „Медицинска генетика“, Медицински университет – Варна

²Лаборатория по медицинска генетика, УМБАЛ „Св. Марина“ – Варна

³Лаборатория по клинична имунология, УМБАЛ „Св. Марина“ – Варна

THE IVS8(N)-T VARIANT IN THE CFTR GENE AS A FACTOR FOR MALE INFERTILITY

Mariy Levkova^{1,2}, Trifon Chervenkov^{1,3}, Mari Hachmeriyan^{1,2}, Lyudmila Angelova¹

¹Department of Medical Genetics, Faculty of Medicine, Medical University of Varna

²Laboratory of Medical Genetics, St. Marina University Hospital, Varna

³Laboratory of Clinical Immunology, St. Marina University Hospital, Varna

РЕЗЮМЕ

CFTR генът е сред новите кандидат-гени, които са необходими за протичането на нормалната сперматогенеза. Различни варианти в него, като например полиморфизма IVS8-(n)T, обаче може да доведат до нарушеното му функциониране и до мъжки инфертилитет. Целта на проучването е да определи дали този вариант се открива и сред българските пациенти с този вид патология.

Проведен е молекулярно-генетичен анализ сред 25 мъже с концентрация на сперматозоидите в еякулата под 5×10^6 на милилитър за определяне на генотипа им по отношение на IVS8(n)-T варианта в CFTR гена. Получените секвенции бяха анализирани и сравнени с референтния човешки геном.

Средната възраст на групата на участници с нарушена сперматогенеза е 34,00 години. Средната концентрация на сперматозоидите в еякулата за изследваната група е $0,30 \times 10^6$ /mL. След провеждане на молекулярно-генетичния анализ за търсене на варианти в CFTR гена се установи един хомозигот (4,00%) по вариант 5T/5T, един (4,00%) хетерозигот 5T/7T. От останалите 20 мъже (80,00%) са хомозиготи за дивия вариант 7T, двама (8,00%) – хетерозиготи за 7T/9T варианта, и един (4,00%) – хомозигот за 9T/9T варианта.

Настоящото проучване установи наличието на 5T варианта в CFTR гена сред изследваните

ABSTRACT

The CFTR gene is one of the new candidate genes, which are thought to be required for normal spermatogenesis. Different variants in this gene, for example IVS8-(n)T polymorphism, could be associated with its impaired functioning and could lead to male infertility. The aim of this study is to investigate whether this variant is found among Bulgarian patients with male infertility.

We conducted molecular genetic testing of 25 men with sperm count below 5×10^6 /mL in order to search for the presence of the IVS8(n)-T variant in their CFTR genes. The derived sequences were analyzed and compared to the human reference genome.

The median age of the participants with impaired spermatogenesis was 34.00 years. The median concentration of the sperm cells in the ejaculate was 0.30×10^6 /mL. After we conducted the molecular genetic analysis for variants in the CFTR gene, it was found that one participant (4.00%) was a homozygote for the 5T/5T variant, and another one (4.00%) was a heterozygote for the 5T/7T variant. As for the remaining participants, 20 men (80.00%) were homozygotes for the wild 7T variant, two (8.00%) – heterozygotes for the 7T/9T variant, and one (4.00%) – a homozygote for the 9T/9T variant.

This study established the presence of the 5T variant in the CFTR gene among the participants with impaired fertility due to azoospermia or severe oligozoospermia. This finding supports the role of

мъже с нарушен фертилитет поради азооспермия или тежка олигозооспермия. Това подкрепя ролята на полиморфизмите в CFTR гена, и по-специално на 5T варианта, като възможен фактор за мъжки инфертилитет.

Ключови думи: CFTR, 5T вариант, мъжки инфертилитет, сперматогенеза

polymorphisms in the CFTR gene and in particular the 5T variant as a reason for male infertility.

Keywords: CFTR, 5T variant, male infertility, spermatogenesis

УВОД

Муковисцидозата (OMIM 219700) е заболяване с автозомно-рецесивен модел на унаследяване. Характерно е, че честота на носителството е различна в отделните страни, като в България тя е равна на 1/33 индивиди. Това означава, че популационната честота на заболяването у нас е 1/3600 живораждания (1). Муковисцидозата засяга множество органи, но основните прояви на болестта са чести респираторни инфекции и екзокринна панкреасна недостатъчност (2). Заболяването обаче се асоциира и с мъжки инфертилитет (14).

Муковисцидозата се причинява от мутации в Cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (CFTR) гена, локализиран в дългото рамо на хромозома 7, като от откриването на гена досега са описани над 2000 различни мутации (4). Тези мутации са разпределени в шест класа според крайния им ефект върху белтъчния продукт (1). Данни от българския регистър на пациенти с муковисцидоза показват, че у нас най-често се открива алелът delF508 – в 58,27% от включените в регистъра, като в 46% от случаите той е комбиниран с друга мутация (3). Независимо от вида на мутацията обаче, се нарушава нормалната функция на CFTR протеина, който служи като канал за преминаване на хлорните йони към апикалната повърхност на епителните клетки (10).

Натрупват се все повече данни, че CFTR генът е необходим и за нормалната оплодителна способност на спермата и нарушенията в този ген може да доведат до намален брой на сперматозоидите в еякулата (14). Мутации в CFTR гена се асоциират не само с вродена липса на vas deferens, но и с необструктивна азооспермия (8). Това може да се дължи на потенциалната му роля в регулирането на водната хомеостаза в тестисите, което се осъществява заедно с аквапорин 9 (7). Също така CFTR протеинът е възможно да участва и в регулацията на Сертолиевите клетки (13).

Всичко това подчертава важната роля на CFTR гена в регулирането на сперматогенезата. Затова и различни варианти в този ген може да повлияят върху фертилитета на засегнатите, като липсват другите типични симптоми за муковисцидоза (6). Един такъв полиморфизъм е вариантът IVS8(n)-T, където с n се обозначава броят на тиминовите бази (6). Той е локализиран в интрон 8 на CFTR гена и води до нарушение в сплайсинга на образувалата се иРНК (6). Мутацията има три варианта с пет, седем или девет тимина (съответно 5T, 7T или 9T вариант) (6). 7T и 9T вариантите се счита, че не оказват фенотипен ефект. Вариантът 5T се асоциира с нарушен сплайсинг на екзон 9, като тази мутация се характеризира с по-високи нива на иРНК с липсващ екзон 9, в сравнение с вариантите 7T и 9T. В резултат се наблюдават намалени количества на CFTR протеина (5).

Като се има предвид потенциалната роля на CFTR гена за нормалната сперматогенеза, е възможно 5T вариантът да се асоциира с мъжки инфертилитет поради нарушена сперматогенеза, изразяваща се с необструктивна азооспермия или тежка олигозооспермия (8). Целта на настоящето проучване е да определи дали този вариант съществува и сред българските пациенти с този вид нарушения на сперматогенезата, което би било от потенциална полза при диагностиката на мъжкия инфертилитет у нас.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДИ

Изследвани са 25 мъже с неизяснен първичен инфертилитет, с нормален кариотип и концентрация на сперматозоидите в еякулата под 5×10^6 на милилитър. След изолиране на ДНК всички участници бяха изследвани за IVS8(n)-T варианта в CFTR гена. Полимеразо-верижната реакция беше проведена в 20 μ l реакционна смес, съдържаща 5x HOT FIREPol EvaGreen qPCR Supermix (Solis BioDyne, Естония), прав и обратен праймер и ДНК на съответния пациент според протокола,

публикуван от Lingyung и съавтори (8). След това анализът беше продължен чрез секвениране по Sanger, като за целта беше използван GenomeLab™ DTCS Quick Start Kit (Beckman Coulter, Германия), според протокола, описан от производителя. Капилярната електрофореза беше извършена чрез GenomeLab™ GeXP (Beckman Coulter, Германия).

Генотиповете на участниците бяха анализирани с помощта на GenomeLab software (Beckman Coulter, Германия) и референтния човешки геном, чиято последователност е достъпна от базата данни NCBI.

Проучването е одобрено от Комисията по етика на научните изследвания към Медицински университет – Варна с протокол №83/16.05.2019. За обработка на получените данни е използвана софтуерната програма Microsoft Office Excel 2016.

РЕЗУЛТАТИ

Средната възраст на групата на участници с нарушена сперматогенеза е 34,00 години (25% перцентил – 30,00; 75% перцентил – 39,50). Минималната възраст е 22 години, а максималната – 47 години.

В групата на мъжете с нарушена сперматогенеза са включени 25 участници, като всички те имаха брой на сперматозоидите в еякулата под $5 \times 10^6/\text{mL}$. От тях 10 мъже (40,00%) бяха с необструктивна азооспермия, а останалите 15 (60,00%) – с тежка форма на олигозооспермия.

Средната концентрация на сперматозоидите в еякулата за изследваната група беше $0,30 \times 10^6/\text{mL}$, стандартно отклонение – 2,02. Най-ниската концентрация на сперматозоиди в еякулата беше $0 \times 10^6/\text{mL}$, съответстваща на азооспермия, а най-високата – $5 \times 10^6/\text{mL}$.

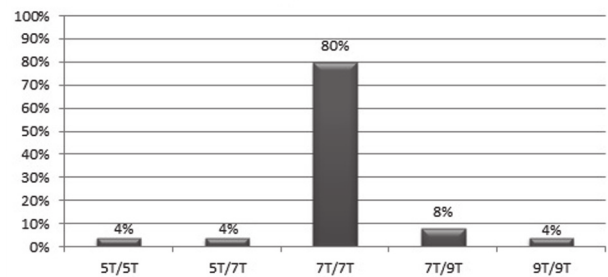
След провеждане на молекулярно-генетичния анализ за търсене на варианти в CFTR гена беше установено, че един участник (4,00%) беше хомозигот за 5T/5T варианта, един участник (4,00%) беше хетерозигот за 5T/7T варианта. Пациентът, който беше хомозигот за 5T варианта, беше с тежка олигозооспермия. Другият пациент, който беше носител на 5T алела в хетерозиготно състояние, беше с азооспермия (Фиг. 1).

От останалите беше установено, че 20 мъже (80,00%) са хомозиготи за дивия вариант 7T, двама (8,00%) – хетерозиготи за 7T/9T варианта, и един (4,00%) – хомозигот за 9T/9T варианта (Фиг. 1).

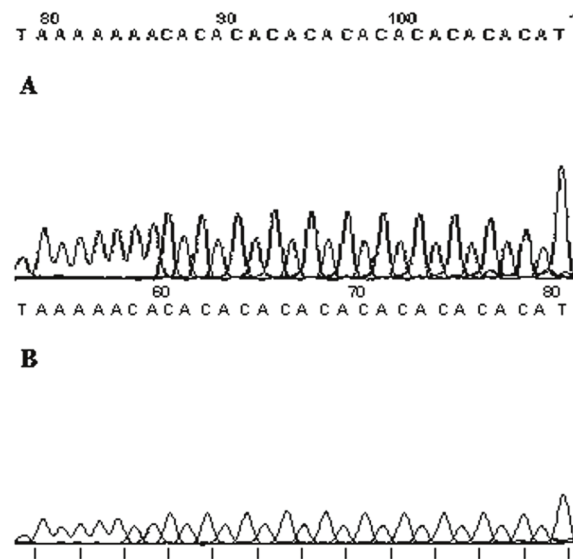
Секвенциите с обратния праймер на пациент, който е хомозигот по 5T варианта, и на друг, който

е хомозигот по 7T варианта, са представени на Фиг. 2.

Установени генотипи за IVS8(n)T вариант



Фиг. 1. Процентно разпределение на установените генотипи по отношение на IVS8(n)-T варианта в CFTR гена



Фиг. 2. Секвенциите с обратния праймер на пациент, който е хомозигот по 5T варианта (А), и на друг, който е хомозигот по 7T варианта (В). А – аденин, С – цитозин, Т – тимин

ОБСЪЖДАНЕ

В последните години расте интересът към мъжкия инфертилитет, като според някои проучвания той е единствената причина за репродуктивните неуспехи на семейството в около 20,0% от случаите (11). Мъжкия фактор е възможно да се изразява в азооспермия, която в около 30,0% се дължи на генетични фактори (9). Това илюстрира важността на установяването на причините за мъжки инфертилитет, особено на молекулярно-генетичните, с цел осигуряване на медико-генетична консултация и подобряване на шансовете за успешна репродукция.

CFTR генът традиционно се асоциира с мъжки инфертилитет поради вродена двустранна

липса на vas deferens (8). Натрупват се обаче все повече данни, че този ген е необходим за нормалната сперматогенеза като цяло (7,13). Особен интерес представлява 5T варианта в CFTR гена. Този полиморфизъм е причина за наблюдаваните по-високи нива на иРНК, при които липсва екзон 9, сравнено с индивиди, при които се наблюдават 7T или 9T вариантите. Като резултат от това и нарушения сплайсинг са налични по-ниски нива на CFTR протеина (5). Това обаче би могло да се разглежда като възможна причина за нарушената сперматогенеза при носителите на 5T варианта. В тези пациенти мъжкият инфертилитет може да е единственият симптом и да липсват други белези, наблюдавани при класическите форми на муковисцидоза (6).

В настоящето проучване в пациентската група беше установено, че един участник (4,00%) беше хомозигот за 5T/5T варианта, а друг пациент (4,00%) – хетерозигот за 5T/7T варианта. Според проучване относно генетичните дефекти при българските пациенти с муковисцидоза, 5T вариантът се среща с честота 0,39% у нас (1). Това разпределение обаче е изчислено въз основа на генотиповете на засегнати с муковисцидоза, докато в настоящия труд популацията се състои от мъже с репродуктивни проблеми. Целенасоченият подбор на пациенти с нарушена сперматогенеза може да обясни установения по-висок процент в представена работа. Извън това, в друго сродно проучване се установява статистически значима по-висока честота на 5T алела сред мъже с нарушена сперматогенеза, сравнено с контролната група ($p < 0.001$) (12). Резултатите от настоящия труд може да послужат като основа за по-нататъшно провеждане на молекулярно-генетичен анализ за търсене на 5T варианта в по-голяма група пациенти, както и сред здрави контроли.

Съществуват и други статии, които съобщават за по-висока честота на 5T варианта сред мъже с нарушена сперматогенеза. Jiang и съавтори обобщават данните от 12 проучвания тип „случай-контрол“, проведени сред мъже с необструктивна азооспермия и търсещи връзка с наличието на 5T варианта в CFTR гена. От направения метаанализ авторският колектив установява, че 5T алелът се среща по-често сред мъжете с необструктивна азооспермия, отколкото в контролните групи (5,00% срещу 0,00%, $p < 0,01$). Също така 5T алелът корелира с по-висок риск за нарушение на сперматогенезата (Отношение на шансовете 2,05; 95% интервал на доверителност 1,85–2,27) (8). Тези данни отново са в подкрепа на

потенциалната роля на 5T варианта като рисков фактор за мъжки инфертилитет.

Трябва да се има предвид обаче, че съществуват и други промени в CFTR гена, които самостоятелно или в комбинация с 5T варианта може да доведат до нарушен фертилитет – например мутациите delF508 и R117H (8). Те не са обект на настоящето проучване. Съществено ограничение на представения труд е и малкият брой пациенти, но настоящата работа може да се разглежда като пилотно проучване с предварителен характер. Необходимо е да се разшири броят на участниците с цел по-пълноценно изследване на ролята на 5T варианта в CFTR гена като фактор за мъжки инфертилитет.

ИЗВОДИ

Настоящото проучване установи наличието на 5T варианта в CFTR гена сред изследваните мъже с нарушен фертилитет поради азооспермия или тежка олигозооспермия. Разпределението сред пациентите на този вариант беше близко до докладваното от други научни групи отново сред мъже с нарушена сперматогенеза. Това подкрепя ролята на полиморфизми в CFTR гена и по-специално на 5T варианта като възможен фактор за мъжки инфертилитет. Резултатите от настоящето проучване обаче трябва да бъдат потвърдени и сред по-голяма група от участници, както и сред здрави контроли.

ЛИТЕРАТУРА

1. Савов, А., Генетични дефекти при пациентите с муковисцидоза в България. In spiro, 2011. 3.
2. Переновска, П., Муковисцидоза – диагноза и лечение. In spiro, 2011. 3.
3. Петрова, Г., et al., Пилотни данни от българския регистър на пациентите с муковисцидоза. Редки болести и лекарства сираци, 2016. 7(3): p. 11-16.
4. Castellani, C. and B.M. Assael, Cystic fibrosis: a clinical view. Cellular and Molecular Life Sciences, 2017. 74(1): p. 129-140.
5. Du, Q., et al., The CFTR M470V, intron 8 poly-T, and 8 TG-repeats detection in Chinese males with congenital bilateral absence of the vas deferens. BioMed research international, 2014. 2014.

6. Ghorbel, M., et al., Screening of $\Delta F508$ mutation and IVS8-poly T polymorphism in CFTR gene in Tunisian infertile men without CBAVD. *Andrologia*, 2012. 44: p. 376-382.
7. Jesus, T.T., et al., Aquaporin-9 is expressed in rat Sertoli cells and interacts with the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator. *IUBMB life*, 2014. 66(9): p. 639-644.
8. Jiang, L., et al., CFTR gene mutations and polymorphism are associated with non-obstructive azoospermia: From case-control study. *Gene*, 2017. 626: p. 282-289.
9. Lee, J.Y., et al., Role of genetics in azoospermia. *Urology*, 2011. 77(3): p. 598-601.
10. Liu, F., et al., Molecular structure of the human CFTR ion channel. *Cell*, 2017. 169(1): p. 85-95. e8.
11. Plaseska-Karanfilska, D., et al., Genetic causes of male infertility. *Balkan Journal of Medical Genetics*, 2012. 15(Supplement): p. 31-34.
12. Tamburino, L., et al., Molecular analysis of mutations and polymorphisms in the CFTR gene in male infertility. *Reproductive biomedicine online*, 2008. 17(1): p. 27-35.
13. Xu, W.M., et al., Defective CFTR-dependent CREB activation results in impaired spermatogenesis and azoospermia. *PLoS one*, 2011. 6(5): p. e19120.
14. Yoon, J.C., et al., Male reproductive health in cystic fibrosis. *Journal of Cystic Fibrosis*, 2019. 18: p. S105-S110.

Адрес за кореспонденция:

*ас. д-р Мария Левкова
Катедра „Медицинска генетика“
Факултет „Медицина“
Медицински университет – Варна
ул. „Марин Дринов“ 55
Варна, 9000
e-mail: maria.levkova171@gmail.com*