

ПАТОГЕННЫЙ ВАРИАНТ 3849+10kbC>T ГЕНА *CFTR* КАК ГЛАВНЫЙ ПРЕДИКТОР СОХРАНЕНИЯ ФЕРТИЛЬНОСТИ У МУЖЧИН С МУКОВИСЦИДОЗОМ

© 2019 г. С. А. Репина^{1, *}, С. А. Красовский², Т. М. Сорокина¹, Л. Ф. Курило¹,
М. И. Штаут¹, Т. А. Адян^{1, 3}, А. В. Поляков¹, В. Б. Черных^{1, 3}

¹Медико-генетический научный центр, Москва, 115522 Россия

²Научно-исследовательский институт пульмонологии

Федерального медико-биологического агентства, Москва, 105077 Россия

³Российский национальный исследовательский медицинский университет
им. Н.И. Пирогова, кафедра молекулярной и клеточной генетики, Москва, 117997 Россия

*e-mail: repina@med-gen.ru

Поступила в редакцию 25.02.2019 г.

После доработки 23.03.2019 г.

Принята к публикации 28.03.2019 г.

Муковисцидоз (МВ) — широко распространенное в европейских популяциях аутосомно-рецессивное заболевание, вызванное патогенными вариантами гена *CFTR*. У большинства мужчин с МВ диагностируют бесплодие вследствие обструктивной азооспермии, однако у некоторых пациентов нет обструкции семявыносящих путей и фертильность может быть сохранена. Влияние генотипа на мужскую репродуктивную систему при МВ недостаточно изучено. Обследованы 87 российских мужчин с муковисцидозом (легочная форма МВ, $n = 44$; смешанная форма МВ, $n = 43$). У 80.5% пациентов выявлены спермиологические признаки двусторонней обструкции семявыносящих путей. У 19.5% пациентов диагностировано сохранение проходимости семявыносящих путей, все они имели легочную форму МВ и патогенный вариант 3849+10kbC>T в компаунд-гетерозиготном состоянии с другим патогенным вариантом гена *CFTR*. Выявлено статистически значимое различие по частоте варианта 3849+10kbC>T между пациентами с сохраненной и нарушенной проходимостью семявыносящих протоков (100% против 8.6%, $p = 0.000001$). Поэтому наличие в генотипе данного варианта гена *CFTR* является фактором возможного сохранения фертильности у мужчин с МВ.

Ключевые слова: муковисцидоз, ген *CFTR*, мужское бесплодие, обструктивная азооспермия, семявыносящие протоки.

DOI: 10.1134/S0016675819120105

Муковисцидоз (МВ, Cystic Fibrosis, CF, OMIM #219700) — одно из наиболее частых моногенных заболеваний в европейских популяциях, его частота в европейской части РФ около 1 : 10000 [1]. МВ характеризуется прогрессирующим течением и поражением различных органов и систем, включая репродуктивную систему. Выделяют две основные клинические формы заболевания: легочную и смешанную [2, 3]. Смешанная форма заболевания характеризуется развитием МВ с панкреатической недостаточностью, легочная форма — МВ с сохраненной функцией поджелудочной железы.

Причиной муковисцидоза являются патогенные варианты гена *CFTR* (*cystic fibrosis transmembrane conductance regulator*), кодирующего муковисцидозный трансмембранный регулятор проводимости — белок хлорного канала, который

экспрессируется на апикальной поверхности эпителиальных клеток желез внешней и смешанной секреции, регулируя вязкость секрета [2, 4]. По тяжести клинических проявлений МВ патогенные варианты в гене *CFTR* подразделяют на “тяжелые” (с нарушением внешнесекреторной функции поджелудочной железы) и “мягкие” (с сохранением внешнесекреторной функции поджелудочной железы) [2, 3, 5–9]. Наиболее распространенным патогенным вариантом *CFTR* является F508del, доля которого в России составляет 33.8–53.5% от общего числа мутантных аллелей [1, 10, 11].

У многих мальчиков-подростков и мужчин с МВ отмечают нарушения репродуктивной системы, в том числе задержку полового созревания, гипогонадизм, гипоплазию тестикул и семенных пузырьков, бесплодие, нарушение проходимости

семявыносящих путей и дисфункцию придаточных половых желез [12–15]. Более 90% мужчин, страдающих МВ, бесплодны вследствие обструктивной азооспермии из-за двустороннего отсутствия/аплазии семявыносящих протоков – *vas deferens* [12]. Вопросы патологии органов репродуктивной системы у мужчин с МВ остаются недостаточно изученными, поэтому выявление генетических и фенотипических факторов нарушения фертильности у пациентов с МВ представляет собой актуальную задачу.

Цель исследования – оценка влияния генотипа по гену *CFTR* и формы муковисцидоза на репродуктивную систему и фертильность у мужчин больных муковисцидозом.

Обследованную выборку составили 87 неродственных мужчин больных муковисцидозом (44 пациента с легочной формой и 43 пациента со смешанной формой) в возрасте от 15 до 39 лет, средний возраст составил 24.9 ± 5.3 лет.

Проведение настоящего исследования одобрено Комитетом по биомедицинской этике Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования “Российский национальный исследовательский медицинский университет им. Н.И. Пирогова” Министерства здравоохранения Российской Федерации, Москва. Всеми пациентами заполнено добровольное информированное согласие на проведение исследования (в случае несовершеннолетних пациентов информированное согласие получено от их родителей).

Стандартное спермиологическое исследование выполняли и его результаты оценивали согласно рекомендациям ВОЗ (2010 г.) [16].

Молекулярно-генетическое исследование гена *CFTR* выполняли на геномной ДНК, выделенной из лейкоцитов периферической крови. Анализировали наличие 30 частых патогенных вариантов: *CFTR*dele2,3(21kb), F508del, I507del, 1677delTA, 2143delT, 2184insA, 394delTT, 3821delT, L138ins, G542X, W1282X, N1303K, R334W, 3849+10kbC>T, 604insA, 3944delGT, S1196X, 621+1G>T, E92K, 3272-26A>G, 4015delA, 4022insT, W1282R, 2789+5G>A, 3272-16T>A, S466X, 1898+1G>A, 3120+1G>A, R347P и S945L. Суммарная информативность данной панели составляет около 90% от общего числа поврежденных хромосом [17]. Для регистрации точечных замен использовали метод мультиплексного аллель-специфичного лигирования с последующей амплификацией (MLPA – multiplex ligation probe-dependent amplification). Некрупные инсерционно-делеционные варианты анализировали методом ПДАФ (полиморфизм длин амплифицированных фрагментов). В случае отсутствия мутации проводили дополнительный анализ гена путем прямого автоматического секвенирования по Сэнгеру на приборе

фирмы Applied Biosystems (США) согласно протоколу фирмы-производителя. Подробно методика детекции патогенных вариантов в гене *CFTR* описана ранее [17].

Статистический анализ результатов выполняли с использованием программы StatSoft STATISTICA 8. Количественные показатели представляли в виде средних значений \pm стандартное отклонение (SD). Статистическое сравнение данных проводили, применяя непараметрические методы. Статистический анализ межгрупповых различий проводили с использованием *U*-критерия Манна–Уитни, критерия Фишера. Значимыми считали различия при уровне вероятности $p < 0.05$.

Патогенные варианты гена *CFTR* обнаружены в 174 (100%) проанализированных аллелей. В группе пациентов с легочной формой МВ выявлены следующие генотипы: F508del/3849+10kbC>T ($n = 15$), составивший 34% от всех генотипов в данной группе; F508del/E92K ($n = 4$) – 9.1%; F508del/2789+5G>A ($n = 4$) – 9.1%; F508del/3272-16T>A ($n = 3$) – 6.8%, F508del/L138ins ($n = 3$) – 6.8%; другие генотипы ($n = 17$) – 34.2%. В группе пациентов со смешанной формой МВ наиболее частым являлся генотип F508del/F508del ($n = 19$), составивший 44.2%; второй по частоте генотип F508del/*CFTR*-dele2,3(21kb) ($n = 3$) – 7.0%, другие генотипы выявлены у 21 (48.8%) пациента. В целом частота и спектр выявленных патогенных вариантов гена *CFTR*, а также представленность генотипов в исследованной выборке пациентов с легочной и смешанной формами МВ отражают таковые у взрослых российских больных с муковисцидозом [1, 18].

Ряд исследований выявили гено-фенотипические корреляции при муковисцидозе в зависимости от “тяжести” генотипа по гену *CFTR* [5, 8, 9, 18]. Нами выявлено влияние генотипа по гену *CFTR* и формы муковисцидоза на спермиологические показатели, существенно отражающие статус мужской фертильности. Спермиологическое исследование выполнено у 81 пациента (с легочной формой, $n = 38$; и смешанной формой, $n = 43$). Азооспермия обнаружена у 70 из 81 (86.4%) обследованных мужчин. Другие формы патозооспермии (олиго-/астено-/тератозооспермия) или нормозооспермия выявлены у 11 (13.6%) пациентов, имеющих легочную форму МВ. Признаки обструкции семявыносящих путей диагностированы у 100% пациентов со смешанной формой и у 27 из 38 (71%) пациентов с легочной формой муковисцидоза. Выявлено статистически значимое ($p = 0.0001$, согласно точному критерию Фишера) различие между группами по частоте азооспермии, свидетельствующей о двусторонней обструкции семявыносящих путей. Таким образом, показано, что частота сохранения проходимости

Таблица 1. Патогенные варианты гена *CFTR* у мужчин больных МВ с сохраненной и нарушенной проходимостью семявыносящих путей

Сохраненная проходимость семявыносящих путей (число исследованных аллелей $n = 34$)			Нарушенная проходимость семявыносящих путей (число исследованных аллелей $n = 140$)		
патогенные варианты	n	%	патогенные варианты	n	%
3849+10kbC>T	17	50.0	F508del	73	52.14
F508del	12	35.3	E92K	9	6.43
CFTRdele2,3	1	2.94	CFTRdele2,3	8	5.7
Q493R	1	2.94	3849+10kbC>T	6	4.3
W1308X	1	2.94	1677delTA	4	2.9
1367del5	1	2.94	2789+5G>A	4	2.9
W1282X	1	2.94	3272-16T>A	3	2.14
			W1282X	3	2.14
			N1303K	3	2.14
			L138ins	3	2.14
			2184insA	2	1.43
			574delA	1	0.71
			G542X	1	0.71
			T604I	1	0.71
			624delT	1	0.71
			1027delG	1	0.71
			185+1G>T	1	0.71
			D542N	1	0.71
			2625delG	1	0.71
			W227R	1	0.71
			2721del11	1	0.71
			G85E	1	0.71
			3659delC	1	0.71
			N415X	1	0.71
			S466X-R1070Q	1	0.71
			2143delT	1	0.71
			W19G	1	0.71
			L1335 P	1	0.71
			3849G>A	1	0.71
			394delTT	1	0.71
			W1282R	1	0.71
			P205T	1	0.71
			621+1G>T	1	0.71

семявыносящих путей зависит от клинической формы МВ.

Патогенные варианты гена *CFTR* у пациентов с МВ и сохранной (без азооспермии, фертильные) либо нарушенной проходимостью (с азооспермией, инфертильные) семявыносящих путей представлены в табл. 1. Структура обнаруженных патогенных вариантов существенно различалась между группами. Так, выявлено статистически значимое

различие по аллельной частоте 3849+10kbC>T между группами пациентов имеющих и не имеющих обструкцию семявыносящих путей (4.3 и 50% соответственно, $p < 0.000001$, согласно точному критерию Фишера).

В обследованной выборке 23 пациента являлись компаунд-гетерозиготами с наличием в генотипе 3849+10kbC>T варианта, характерного для легочной формы МВ. У восьми (35%) из них в

Таблица 2. Сравнительная характеристика пациентов с вариантом 3849+10kbC>T гена *CFTR* с сохраненной и с нарушенной проходимостью семявыносящих путей

Показатель	Пациенты с МВ с сохраненной проходимостью семявыносящих путей, $n = 17$	Пациенты с МВ с нарушенной проходимостью семявыносящих путей, $n = 6$
Средний возраст, лет	25.4 ± 6.6*	27.3 ± 7.3*
Форма МВ	Легочная	Легочная
Генотип по гену <i>CFTR</i> , число пациентов (n)	F508del/3849+10kbC>T ($n = 12$), CFTRdele2,3/3849+10kbC>T ($n = 1$), Q493R/3849+10kbC>T ($n = 1$), W1308X/3849+10kbC>T ($n = 1$), 1367del5/3849+10kbC>T ($n = 1$), W1282X/3849+10kbC>T ($n = 1$)	F508del/3849+10kbC>T ($n = 2$), S466X-R1070Q/3849+10kbC>T ($n = 1$), N1303K/3849+10kbC>T ($n = 1$), 2184insA/3849+10kbC>T ($n = 1$), W1282R/3849+10kbC>T ($n = 1$)

* Различие незначимо ($p = 0.56$, согласно U -критерию Манна–Уитни).

анамнезе отмечено наступление у партнерш беременности естественным путем (у семи пациентов родились здоровые дети, у одного – беременность у супруги была прервана медицинским абортom по желанию), что свидетельствует о сохраненной у них ранее фертильности. Хотя следует отметить, что молекулярно-генетическое исследование на отцовство у данных пациентов не проводили. В целом у 17 из 23 (74%) пациентов с вариантом 3849+10kbC>T по данным спермиологического исследования или по данным анамнеза (беременности у партнерш) выявлено сохранение проходимости семявыносящих путей. Среди носителей данного патогенного варианта обструкция диагностирована у шести из 23 (26%) пациентов. У всех 64 мужчин с МВ, не имеющих варианта 3849+10kbC>T в генотипе, выявлена азооспермия, указывающая на непроходимость семявыносящих путей. Выявлено статистически значимое различие как по частоте варианта 3849+10kbC>T у пациентов с сохраненной и нарушенной проходимостью семявыносящих протоков (100% ($n = 17$) против 8.6% ($n = 6$) соответственно), так и по встречаемости обструкции семявыносящих протоков у пациентов, имеющих и не имеющих данный патогенный вариант ($p < 0.000001$, согласно точному критерию Фишера).

3849+10kbC>T относится к “мягким” патогенным вариантам, частота которого у российских пациентов с муковисцидозом составляет 1.7–3.2% аллелей гена *CFTR* [10, 11, 17, 18]. У взрослых пациентов с МВ он является третьим по частоте патогенным вариантом гена *CFTR*, который регистрируют с частотой 5.33% [1]. В представленной выборке патогенный вариант 3849+10kbC>T отмечен несколько чаще, что может быть связано с особенностями выборки, в частности с возможностью проведения андрологического обследования пациентов, учитывая их состояние здоровья. Наличие у больного МВ варианта 3849+10kbC>T

может определять нормальные или пограничные уровни содержания хлоридов в поте, диагноз этим больным ставится в более позднем возрасте и заболевание протекает в относительно легкой форме [19, 20]. У компаунд-гетерозигот по данному аллелю в сочетании с другим, в том числе с “тяжелым” патогенным вариантом гена *CFTR*, проходимость семявыносящих путей и репродуктивная функция могут быть сохранены [6, 7, 12, 18–21].

Сравнительный анализ генотипов у мужчин с наличием варианта 3849+10kbC>T, имеющих и не имеющих обструкцию семявыносящих протоков, не выявил особенности второго патогенного варианта. В частности, генотип F508del/3849+10kbC>T являлся самым частым в обеих подгруппах, но чаще отмечен у пациентов с нарушенной (у 12 из 17 пациентов), чем сохраненной (у двух из шести пациентов), проходимостью семявыносящих путей (табл. 2). Оценить влияние других патогенных вариантов у данных компаунд-гетерозигот не представляется возможным, так как они встречались в каждой из групп однократно. Следует отметить, что у пациентов с сохраненной проходимостью средний возраст был меньше, однако статистически значимых различий не выявлено ($p = 0.56$, согласно U -критерию Манна–Уитни).

У обследованных нами мужчин с муковисцидозом выявлена меньшая частота азооспермии по сравнению с данными литературы [2, 12]. Вероятно, это обусловлено особенностями выборки, в частности более высокой частотой патогенного варианта 3849+10kbC>T по сравнению с его частотой у взрослых российских пациентов с МВ (13.2% против 5.33% аллелей соответственно), а также молодым возрастом у многих из обследованных нами пациентов. Кроме того, необходимо учесть и тот факт, что мужчины с МВ, не имеющие азооспермии, также могут иметь проблему

деторождения из-за наличия не столь тяжелых форм патозооспермии и/или других факторов.

Таким образом, установлено, что генотип по гену *CFTR* оказывает существенное влияние на половую систему у мужчин с МВ, являясь основным генетическим предиктором сохранения у них репродуктивной функции. Наличие варианта 3849+10kbC>T, легочной формы МВ и отсутствие тяжелых форм патозооспермии являются значимыми факторами сохраненной проходимости семявыносящих путей и возможной фертильности у мужчин с муковисцидозом.

Работа выполнена в рамках государственного задания Министерства науки и высшего образования Российской Федерации.

Все процедуры, выполненные в исследовании с участием людей, соответствуют этическим стандартам институционального и/или национально-го комитета по исследовательской этике и Хельсинкской декларации 1964 г. и ее последующим изменениям или сопоставимым нормам этики.

От каждого из включенных в исследование участников было получено информированное добровольное согласие.

Авторы заявляют, что у них нет конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Красовский С.А., Черняк А.В., Воронкова А.Ю. и др. Регистр больных муковисцидозом в Российской Федерации. 2016 год. М.: Медпрактика-М, 2018. 64 с.
2. Капранов Н.И., Каширская Н.Ю. Муковисцидоз. М.: Медпрактика-М, 2014. 672 с.
3. Michl R.K., Tabori H., Hentschel J. et al. Clinical approach to the diagnosis and treatment of cystic fibrosis and CFTR-related disorders // Expert Rev. Respir. Med. 2016. V. 10. № 11. P. 1177–1186. <https://doi.org/10.1080/17476348.2016.1240032>
4. Welsh M.J., Smith A.E. Molecular mechanisms of CFTR chloride channel dysfunction in cystic fibrosis // Cell. 1993. V. 73. № 7. P. 1251–1254.
5. Kerem B., Kerem E. The molecular basis for disease variability in cystic fibrosis // Eur. J. Hum. Genet. 1996. V. 4. № 2. P. 65–73.
6. Mickle J.E., Cutting G.R. Genotype-phenotype relationships in cystic fibrosis // Med. Clin. North Am. 2000. V. 84. № 3. P. 597–607.
7. Rowntree R.K., Harris A. The phenotypic consequences of CFTR mutations // Ann. Hum. Genet. 2003. V. 67. № 5. P. 471–485.
8. Salvatore F., Scudiero O., Castaldo G. Genotype-phenotype correlation in cystic fibrosis: the role of modifier genes // Am. J. Med. Genet. 2002. V. 111. № 1. P. 88–95. <https://doi.org/10.1002/ajmg.10461>
9. Zielenski J. Genotype and phenotype in cystic fibrosis // Respiration. 2000. V. 67. № 2. P. 117–133. <https://doi.org/10.1159/000029497>
10. Петрова Н.В. Молекулярно-генетические особенности муковисцидоза в российских популяциях // Мед. генетика. 2006. Т. 5. № 1. С. 19–24.
11. Степанова А.А., Красовский С.А., Поляков А.В. Информативность поиска 19 частых мутаций в гене *CFTR* у российских больных муковисцидозом и расчетная частота заболевания в Российской Федерации // Генетика. 2016. Т. 52. № 2. С. 231–241.
12. Черных В.Б. Ген муковисцидоза и нарушение фертильности у мужчин // Андрология и генитальная хирургия. 2010. Т. 4. С. 23–31.
13. Штайм М.И., Шилейко Л.В., Ренина С.А. и др. Комплексное сперматологическое обследование пациентов с муковисцидозом // Андрология и генитальная хирургия. 2017. Т. 18. № 4. С. 69–76. <https://doi.org/10.17650/2070-9781-2017-18-4-69-76>
14. Fok K.L., Chen H., Ruan Y.C., Chan H.C. Novel regulators of spermatogenesis // Seminars in Cell and Developmental Biology. 2014. V. 29. P. 31–42. <https://doi.org/10.1016/j.semcdb.2014.02.008>
15. Marcorelles P., Gillet D., Friocourt G. et al. Cystic fibrosis transmembrane conductance regulator protein expression in the male excretory duct system during development // Hum. Pathology. 2012. V. 43. № 3. P. 390–397. <https://doi.org/10.1016/j.humpath.2011.04.031>
16. Курило Л.Ф. Руководство ВОЗ по исследованию и обработке эякулята человека. 5-е изд. / Пер. с англ. Макарова Н.П. М.: Капитал Принт, 2012. 291 с.
17. Адян Т.А., Степанова А.А., Красовский С.А., Поляков А.В. Расширение диагностического спектра повторяющихся мутаций в гене *CFTR* // Генетика. 2018. Т. 54. № 10. С. 1207–1217.
18. Красовский С.А., Петрова Н.В., Степанова А.А. и др. Клиническое течение заболевания у взрослых больных муковисцидозом-носителей “мягких” мутаций // Пульмонология. 2012. Т. 6. С. 5–11. <https://doi.org/10.18093/0869-0189-2012-0-6-5-11>
19. Feldmann D., Couderc R., Audrezet M.P. et al. CFTR genotypes in patients with normal or borderline sweat chloride levels // Hum. Mutat. 2003. V. 22. № 4. P. 340. <https://doi.org/10.1002/humu.9183>
20. Augarten A., Kerem B.S., Yahav Y. et al. Mild cystic fibrosis and normal or borderline sweat test in patients with the 3849+10kb C to T mutation // Lancet. 1993. V. 342. № 8862. P. 25–26.
21. Duguépéroux I., De Braekeleer M. The CFTR 3849+10kbC>T and 2789+5G>A alleles are associated with a mild CF phenotype // Eur. Respir. J. 2005. V. 25. № 3. P. 468–473. <https://doi.org/10.1183/09031936.05.10100004>

***CFTR* Gene Pathogenic Variant 3849+10kbC>T as a Major Predictor of Preserved Fertility in Male Patients with Cystic Fibrosis**

S. A. Repina^{a,*}, S. A. Krasovskiy^b, T. M. Sorokina^a, L. F. Kurilo^a, M. I. Shtaut^a,
T. A. Adyan^{a,c}, A. V. Polyakov^a, and V. B. Chernykh^{a,c}

^aResearch Centre for Medical Genetics, Moscow, 115522 Russia

^bPulmonology Research Institute, Moscow, 105077 Russia

^cDepartment of Molecular and Cell Genetics, Pirogov Russian National Research Medical University, Moscow, 117997 Russia

*e-mail: repina@med-gen.ru

Cystic fibrosis (CF) is an autosomal recessive disorder predominantly found in European populations and caused by pathogenic variants of the *CFTR* gene. A most of men with CF are infertile due to obstructive azoospermia, but some patients haven't obstruction of the vas deferens and may be fertile. The effect of the genotype on the reproductive system in CF male patients is not well understood. 87 Russian men with CF (pancreatic-sufficient CF, $n = 44$; pancreatic-insufficient CF, $n = 43$) were examined. Spermatological signs of bilateral obstruction of vas deferens were revealed in 80.5% patients. An absence of the obstruction was found in 19.5% patients, that developed the pancreatic-sufficient CF, having the compound-heterozygous pathogenic variant 3849+10kbC>T. Statistically significant difference in the frequency of this allelic variant between patients with non-obstructed and obstructed vas deferens was found (100% vs. 8.6%, $p = 0.000001$). Therefore, pathogenic *CFTR* gene variant 3849+10kbC>T is a factor of preserved fertility in male patients with CF.

Keywords: cystic fibrosis, *CFTR* gene, male infertility, obstructive azoospermia, *vas deferens*.