

Мутации гена *CFTR* у мужчин с бесплодием

Соловьева (Маркова) Е.В., Татару Д.А., Преда О.Г., Артюхова В.Г., Секира А.Г., Деревьева В.Ю., Махалова Н.А., Новосельцева А.В., Рендашкин И.В., Зайцева Т.А., Кеосьян Н.В., Сereбrenникова О.А.

Красноярский центр репродуктивной медицины, Красноярск, 660037, ул. Коломенская, д.26, e-mail: genlab.kcrm@mail.ru

Исследование мутаций гена *CFTR*, рекомендовано наряду с МВ при аплазии семявыносящих протоков. Ассоциация мутаций гена *CFTR* с другими формами мужского бесплодия остается неясной. Нами обследовано 2146 мужчин с репродуктивными нарушениями в супружеской паре. Анализ мутаций гена *CFTR* (большинство лиц обследовано на 16 мутаций) и поли-Т-полиморфизма интрона 8 (IVS8) выполнен для всех лиц, включенных в исследование. У 1820 из них изучены параметры эякулята. В случае аллелей 5T IVS8 гена *CFTR* проведено молекулярное гаплотипирование повторов TG, сцепленных с аллелем 5T. Среди обследованных мужчин мы выявили 12 случаев компаундных генотипов (все мужчины были с азооспермией) и 4,2% лиц с одной мутацией. Среди аллелей 5T к патогенетически значимым мутациям относили только 5T-12TG и 5T-13TG. Частота мутаций гена *CFTR* была достоверно выше в группе лиц с азооспермией в сравнении с олигозооспермией, тяжелой олигозооспермией, астенозооспермией и нормозооспермией. В случаях выявления компаундных генотипов у мужчин нами было детально проанализировано лечение бесплодия, проведенное в нашем центре с использованием методов ВРТ (N = 8). Всего выполнено 13 лечебных циклов ЭКО-ИКСИ и два — искусственной инсеминации с донорскими сперматозоидами. Во всех случаях при биопсии яичек получены тестикулярные сперматозоиды приемлемого для ИКСИ качества. Беременности и роды получены у 7 из 8 супружеских пар.

Ключевые слова: *CFTR*, мужское бесплодие, азооспермия, ВДОСП, аллель 5T и повторы IVS8, тестикулярные сперматозоиды, ЭКО-ИКСИ.

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

CFTR mutations in male infertility

Solovyova (Markova) E.V., Tataru D.A., Preda O.G., Artyukhova V.G., Sekira A.G., Derevyeva V.Yu., Makhalova N.A., Novoseltseva A.V., Rendashkin I.V., Zaitseva T.A., Keosyan N.V., Serebrennikova O.A.

Krasnoyarsk Center for Reproductive Medicine, Kolomenskaya str., 26, Krasnoyarsk, 660037, Russia, e-mail: genlab.kcrm@mail.ru

CFTR mutation analysis is recommended for congenital bilateral aplasia of the vas deferens as well as for cystic fibrosis. Aside azoospermia, the association of *CFTR* mutations with male infertility is still unclear. A total of 2146 men from couples with reproductive problems were screened for *CFTR* mutation and intron 8 poly-T polymorphism (IVS8). Semen analysis was examined for 1820 men. Molecular haplotyping to detect linked TG repeats was performed for IVS8 5T cases. Among 5T alleles only 5T-12TG and 5T-13TG were classified as mutations. Our data showed that 12 patients were compound heterozygotes (all azoospermic) and 4.2% patients were carriers of one mutation. *CFTR* mutation frequency was significantly higher for azoospermia group to compare with oligozoospermia, severe oligozoospermia, asthenozoospermia and normozoospermia groups. For couples in which man had compound genotype we analyzed infertility treatment accomplished in our clinic (N = 8): 13 IVF-ICSI cycles (in vitro fertilization and intracytoplasmic sperm injection) and two artificial inseminations with donor sperms. Acceptable quality testicular sperms for ICSI have been received by testicular biopsy in all cases. Pregnancy and delivery were achieved for 7 couples.

Key words: *CFTR*, male infertility, azoospermia, CBAVD, IVS8 5T and TG repeats, testicular sperms, IVF-ICSI.

Введение

Мутации гена *CFTR* (трансмембранного регулятора муковисцидоза, OMIM 602421) ассоциированы с бесплодием у мужчин, преимущественно, в связи с obstructивными нарушениями семявыводящих путей. Врожденное двустороннее отсутствие семявыносящих протоков (ВДОСП; CBAVD congenital bilateral aplasia of the vas deferens) является частью симптомокомплекса муковисцидоза (МВ; OMIM 219700) у мужчин. Изолированный синдром ВДОСП представляет собой самостоятельное аутосомно-рецессивное заболевание (OMIM 277180) и относится

к категории *CFTR*-связанных болезней. Для мужчин с МВ и ВДОСП характерна азооспермия, при этом у большинства сперматогенез сохранен [1, 2, 3, 4]. В отсутствие сперматозоидов в эякуляте, планирование беременности возможно только с использованием методов вспомогательных репродуктивных технологий (ВРТ). Тестикулярные или эпидидимальные сперматозоиды могут быть получены путем биопсии яичка или придатка яичка и использованы для оплодотворения методом ЭКО-ИКСИ (экстракорпорального оплодотворения с инъекцией сперматозоида в яйцеклетку) [2, 4]. На сегодняшний день деталь-

ные сведения о результатах лечения бесплодия для таких пациентов только накапливаются. Альтернативным методом лечения бесплодия при азооспермии служит использование сперматозоидов донора.

По структуре мутаций ВДОСП отличается от МВ [1, 2, 3]. Для ВДОСП характерно наличие одной «тяжелой» и одной «мягкой» мутации. Особое внимание уделяется аллелю 5Т интрона 8 (IVS8 с.1210-12Т[5]) гена *CFTR* [1, 2, 3, 5]. Варианты 7Т и 9Т поли-Т-последовательности на границе интрона 8 и экзона 9 (интрона 9 и экзона 10 по новой номенклатуре) считают нейтральными, а аллель 5Т рассматривается в качестве «мягкой» мутации [2, 3]. Более короткий вариант из 5 тимидиновых повторов служит фактором нарушения сплайсинга и формирования белкового продукта, лишённого последовательности, кодируемой экзоном 9 [3]. Повышенная частота аллеля 5Т выявляется при ВДОСП [2, 3]. Дальнейшие исследования выявили, что пенетрантность аллеля 5Т варьирует и зависит от числа повторов TG, предшествующих поли-Т-последовательности интрона 8. К настоящему времени накоплены данные о том, что клиническое значение имеют аллели 5Т, которым предшествуют 12 или 13 TG [3, 5, 6]. Данные о значении аллеля 5Т и рекомендации в отношении тестирования и интерпретации остаются противоречивыми [5, 7, 8].

В разных руководствах показания для анализа мутаций гена *CFTR* при мужском бесплодии варьируют. Наиболее четким показанием для диагностического тестирования является ВДОСП [2, 5, 8, 9, 10]. Более широкими показаниями служат обструктивная азооспермия и тяжелая олигозооспермия (при нормальном кариотипе) [10], азооспермия как обструктивная, так и необструктивная [11], мужское бесплодие в целом [12]. Проводятся исследования ассоциации мутаций гена *CFTR* с разными типами мужского бесплодия, однако вопрос о роли мутаций гена *CFTR* при мужском бесплодии, кроме азооспермии, остается неясным [3, 13]. Скрининг носительства рекомендован для бесплодных супружеских пар, наряду со скринингом носительства у любых лиц без случаев МВ в семье и просто супружеских пар, планирующих беременность [5, 8].

Целью настоящего исследования явился анализ случаев мутаций гена *CFTR*, включая аллель 5Т, у мужчин с бесплодием, а также анализ результатов лечения бесплодия с использованием методов ВРТ для случаев компаундных генотипов у мужчин.

Материалы и методы

В исследование включены результаты генотипирования 2146 неродственных мужчин с репродуктивными нарушениями, которое проводилось в Красноярском центре репродуктивной медицины (КЦРМ). Возраст обследованных был 18—59 лет ($33,41 \pm 0,12$ года). Среди обследованных мужчин 39% составили жители г.Красноярска, 18% — жители других населенных пунктов Красноярско-

го края, по 6% — Новосибирской и Омской областей, 5% — Республики Хакасия, 9% — других регионов; для 17% не было данных о месте проживания. Обследованные мужчины были, преимущественно, европеоидами, жителями городов; только 7% обследованных были из сельской местности. Большинство обследованных мужчин проходили обследование и лечение в КЦРМ с 2004 по июль 2017 гг. Часть образцов биоматериала для молекулярно-генетического исследования (13,6%) была получена из других клиник по лечению бесплодия. Мужчины, обследованные в связи с семейными случаями МВ, пренатальной или преимплантационной диагностики, а также с мутациями, выявленными в других лабораториях, исключались из анализа. В исследование включены данные о параметрах эякулята, полученных в КЦРМ ($N = 1820$). В случаях выявления компаундных генотипов у мужчин были проанализированы результаты лечения бесплодия в супружеской паре с использованием методов ВРТ, проведенного в КЦРМ (8 супружеских пар). Возраст женщин на момент начала лечебного цикла ЭКО составил 28—37 лет ($32,6 \pm 1,0$ года).

Молекулярно-генетическое исследование гена *CFTR* включало анализ частых мутаций и анализ поли-Т-полиморфизма интрона 8 гена. Повторы TG интрона 8 исследовали только для образцов, несущих аллель 5Т. В 25% полиморфизм интрона 8 проанализирован ретроспективно. Для исследования использовали геномную ДНК, выделенную из периферической крови с использованием набора «АмплиПрайм ДНК-сорб В» (ранее «ДНК-сорб В»; НекстБио). У большинства обследуемых (90%) выполнен анализ 16 частых мутаций гена *CFTR*: CFTRdels2,3(21kb), F508del, I507del, 1677delTA, 2143delT, 2184insA, 394delTT, W1282X, N1303K, R117H, L138ins, G542X, G551D, R553X, R347P, R334W. Анализ мутаций проводили методом ПЦР с последующим фрагментным анализом либо рестрикционным анализом с детекцией в полиакриламидном геле. Часть пациентов (10%) обследована на меньшее число мутаций (8—14) из числа вышеперечисленных. Дополнительно у 10 чел. выполнен анализ 32 мутаций с использованием тест-системы «Cystic Fibrosis Genotyping Assay» (Abbott Molecular, США). Полиморфизм интрона 8 исследовали методом ПЦР и фрагментного анализа по предложенной нами схеме, описанной ранее [14]. Во всех сериях применяли положительный и отрицательный контроли. В случае выявленной мутации (мутаций) все супружеские пары, обследовавшиеся в КЦРМ, проходили медико-генетическое консультирование.

Общий анализ эякулята выполнялся в соответствии с рекомендациями ВОЗ по исследованию и обработке эякулята человека. Анализ концентрации и подвижности сперматозоидов проводили микроскопически в камере Маклера. Заключение по показателям эякулята, выполненные до 2010 года, были пересмотрены в соответствии с референсными значениями текущего руководства ВОЗ [15]. В группу «Азооспермии» вошли случаи от-

сутствия сперматозоидов в нативном эякуляте и после центрифугирования по результатам, по меньшей мере, двукратного исследования. К олигозооспермии отнесены образцы с концентрацией сперматозоидов менее 15 млн/мл. Случаи криптозооспермии и олигозооспермии с концентрацией сперматозоидов 5 млн/мл и менее выделены в отдельную группу «Тяжелая олигозооспермия». Если в эякуляте при одном исследовании сперматозоиды не обнаруживались, а в другом находили хотя бы единичные после центрифугирования, пациенты включались в группу тяжелой олигозооспермии. К астенозооспермии отнесены образцы, содержащие менее 32% прогрессивно-подвижных сперматозоидов. Для случаев, когда параметры одного исследования эякулята свидетельствовали о нормозооспермии, другого — об отклонениях от нормативных параметров, выделена отдельная группа, обозначенная как «Нормо/патоспермия». Для 55% пациентов были доступны данные о двух и более исследованиях эякулята.

Лечение бесплодия проводилось методом ЭКО-ИКСИ с использованием собственных тестикулярных сперматозоидов (ТС), полученных с использованием тестикулярной биопсии, либо с использованием донорских сперматозоидов (ДС) методом внутриматочной инсеминации (ИИ), либо ЭКО-ИКСИ. ТС были получены методом открытой биопсии в КЦРМ или в Красноярской межрайонной клинической больнице №4. После проведения диагностической биопсии тестикулярную ткань криоконсервировали для использования в лечебном цикле. Женщинам проводилась стимуляция суперовуляции по стандартным протоколам. Перенос эмбрионов (ПЭ) выполняли, преимущественно, на пятые сутки развития эмбриона. При наличии морфологически качественных эмбрионов после ПЭ, при согласии пациентов оставшиеся эмбрионы криоконсервировали для последующего переноса размороженных эмбрионов (ПРЭ).

Для оценки статистической значимости различий использовали критерий χ^2 , в ряде случаев с поправкой Йетса ($N < 10$).

Результаты

Анализ мутаций и поли-Т-полиморфизма интрона 8 гена *CFTR* выполнен в 2146 образцах ДНК мужчин с репродуктивными нарушениями. В табл. 1 представлены генотипы с мутациями гена *CFTR*, параметры спермограммы, выявленные у обследованных мужчин.

Нами выявлено семь компаундных генотипов в 12 случаях, что составило 0,56% от всех обследованных мужчин и 11,8% среди мужчин с выявленными мутациями. Все компаундные генотипы содержали одну «тяжелую», другую «мягкую» мутацию. Исключение составил один случай комбинации «мягких» мутаций L138ins и 5T-12TG. Для всех мужчин с двумя мутациями была характерна азооспермия. Самым частым вариантом компаундного генотипа был F508del/R117H. В составе ком-

паундов наиболее часто выявлялись мутации F508del и 5T-12TG (по 7 из 24 хромосом).

Случаи одной мутации в генотипе составили 4,2% от всех обследованных и 88,2% среди пациентов с выявленными мутациями. Параметры эякулята в группе мужчин с одной мутацией гена *CFTR* варьировали от нормозооспермии до азооспермии. В данной группе также преобладали носители F508del и 5T-12/13TG (1,5 и 1,7% всех обследованных). Носительство мутации L138ins выявлено в 5 случаях (в четырех из них у пациентов была азооспермия), R117H — в 4-х случаях (три с азооспермией). По три выявлено носителей мутаций CFTRdele2,3(21kb) и R334W (все с разными параметрами эякулята), два случая — мутации 394delTT. По одному случаю найдено с мутациями G542X, N1303K, W1282X, R347P.

Для всех образцов с мутациями в табл. 1 представлены данные по поли-Т-полиморфизму интрона 8, а при наличии аллеля 5T — детализация по предшествующим повторам TG. Аллели 5T, сцепленные с 12TG и 13TG, интерпретировались как «мягкие» мутации и генотипы, содержащие такие аллели, включались в состав генотипов с мутациями. Варианты 5T-12TG и 5T-13TG проанализированы как один аллельный вариант (5T-12/13TG). Носителями 5T-12TG были 33 мужчины, которые различались по показателям спермограммы. Среди них обнаружены все варианты от нормозооспермии до азооспермии. Аллель 5T-13TG встречался реже и выявлен нами у четырех пациентов, которые также различались по показателям спермограммы (нормозооспермия, олигозооспермия, тяжелая олигозооспермия, азооспермия). Аллель 5T-11TG относили к варианту нормы. У одного из носителей L138ins в генотипе присутствовал аллель 5T-11TG (табл. 1). Пациент дважды проходил спермиологическое исследование; концентрация сперматозоидов составила в одном случае 16 млн/мл, во втором — 63 млн/мл, процент прогрессивно-подвижных сперматозоидов был снижен в обоих случаях (7,5 и 15% соответственно).

Среди обследованных мужчин, нами выявлено два случая гомозиготного по аллелю 5T генотипа. Один из них представлен в табл. 1, поскольку содержал аллель 5T-12TG; вторым аллелем был вариант 5T-11TG. В трех анализах эякулята у пациента с генотипом 5T-12TG/5T-11TG концентрация сперматозоидов была 25, 40 и 43 млн/мл; процент прогрессивно-подвижных сперматозоидов был снижен в двух из трех исследований: 24, 17 и 51%. Другой гомозиготный по аллелю 5T пациент был гомозиготен по повторам 11TG (5T-11TG/5T-11TG). По данным спермограммы у пациента была тяжелая олигозооспермия (единичные сперматозоиды в эякуляте по данным нескольких исследований).

Для всех генотипов, содержащих мутацию F508del ($N = 39$, табл. 1), можно отметить сцепление с аллелем 9T, которое было достоверным в сравнении со всеми хромосомами, не несущими мутацию F508del ($N = 3796$; $\chi^2 = 145,8$ $P < 0,001$).

Таблица 1

**Генотипы с мутациями гена *CFTR* и данные спермограммы,
выявленные у мужчин с репродуктивными нарушениями (N = 2146)**

Генотип			Спермограмма		Генотип по IVS8 поли-Т, TG для 5T, (N)
№	Мутации	N (%*)	Заключение	N	
1	F508del/R117H	4	Азооспермия	4	9T/7T
2	F508del/5T-12TG	2	Азооспермия	2	9T/5T-12TG
3	F508del/L138ins	1	Азооспермия	1	9T/7T
4	G542X/5T-12TG	2	Азооспермия	2	9T/5T-12TG
5	del21kb/5T-12TG	1	Азооспермия	1	7T/5T-12TG
6	N1303K/5T-12TG	1	Азооспермия	1	9T/5T-12TG
7	L138ins/5T-12TG	1	Азооспермия	1	7T/5T-12TG
	Компаунды, все	12 (0,56%)			
8	-/F508del	32 (1,49%)	Азооспермия	10	7T/9T (9), 9T/9T (1)
			Тяж. олигозоосп.	4	7T/9T
			Олигозоосп.	3	7T/9T
			Астенозоосп.	4	7T/9T
			Нормозоосп.	3	7T/9T
			Нормо/патосп.	3	7T/9T
			н/д	5	7T/9T (4), 9T/9T (1)
9	-/5T-12TG, -/5T-13TG	37 (1,72%)	Азооспермия	5	7T/5T-12TG(3), 9T/5T-12TG (1), 9T/5T-13TG (1)
			Тяж. олигозоосп.	11	7T/5T-12TG (8), 9T/5T-12TG (2), 7T/5T-13TG (1)
			Олигозоосп.	2	7T/5T-12TG, 9T/5T-12TG
			Астенозоосп.	1	7T/5T-12TG
			Нормозоосп.	4	7T/5T-12TG(3), 7T/5T-13TG (1)
			Нормо/патосп.	6	5T-11TG/5T-12TG (1) 7T/5T-12TG (3), 9T/5T-12TG (1), 7T/5T-13TG (1)
			н/д	8	7T/5T-12TG (7), 9T/5T-12TG (1)
10	-/L138ins	5 (0,23%)	Азооспермия	4	7T/7T
			Астенозоосп.	1	7T/5T-11TG
11	-/R117H	4 (0,19%)	Азооспермия	3	7T/7T
			Олигозоосп.	1	7T/7T
12	-/del21kb	3 (0,14%)	Олигозоосп.	1	7T/7T
			Астенозоосп.	1	7T/7T
			Нормозоосп.	1	7T/7T
13	-/R334W	3 (0,14%)	Олигозоосп.	2	7T/7T, 7T/9T
			Нормо/патосп.	1	9T/9T
14	-/394delTT	2 (0,09%)	Нормозоосп.	1	7T/9T
			н/д	1	7T/9T
15	-/G542X	1 (0,05%)	Азооспермия	1	7T/9T
16	-/N1303K	1 (0,05%)	Азооспермия	1	7T/9T
17	-/W1282X	1 (0,05%)	Азооспермия	1	7T/7T
18	-/R347P	1 (0,05%)	Нормозоосп.	1	7T/7T
	Носители, все	90 (4,19%)			

Примечание. %* — от общего числа обследованных; «-» — нормальный аллель в отношении исследованных мутаций;
н/д — нет данных; del21kb=CFTRdele2,3(21kb).

В отдельных случаях у выявленных нами носителей мутаций гена *CFTR* были зафиксированы другие генетические нарушения. Из представленных в табл. 1 случаев, у носителя мутации G542X обнаружена микроделеция локуса AZFc Y-хромосомы, а у одного из носителей F508del — синдром Клайнфельтера.

Полученные нами данные свидетельствуют о том, что многие пациенты с мутациями гена *CFTR* характеризуются нарушениями параметров эякулята. В то же время, такие пациенты составляют основную категорию обследуемых в репродуктивном центре мужчин. На основании сведений из направлений на генетические исследования, поступающих в лабораторию вместе с образцами биоматериала, распределить пациентов на группы по наличию или отсутствию мужского фактора бесплодия оказалось невозможным. Поэтому был проведен анализ результатов исследования спермограммы. Пациенты с азооспермией составили 17,9% генотипированных мужчин, с тяжелой олигозооспермией и криптозооспермией — 15,5%, олигозооспермией — 12,9%, астенозооспермией — 9,7%, пациенты, отнесенные к категории «Нормо/патоспермия» — 15,1%. У 13,4% мужчин была нормозооспермия. Для 15,6% параметры эякулята остались неизвестными. В табл. 2 представлены частоты мутаций гена *CFTR* и аллеля 5T в зависимости от типа нарушения параметров спермограммы.

Как видно из представленных в табл. 2 данных, группа пациентов с азооспермией достоверно отличалась от других групп по частоте мутаций гена *CFTR*. Частота мутаций гена *CFTR* при азооспермии составила 4,8%. Компанудные генотипы обнаружены нами только при азооспермии. Доля компанудов составила 3,1% (12/384) среди пациентов с азооспермией. Для групп олигозооспермии, тяжелой олигозооспермии, астенозооспермии не выявлено достоверных различий между собой и

с группами «Нормозооспермия» или «Нормо/патоспермия». Для этих групп частота мутаций была 0,6—1,4%.

Интерпретация клинического значения аллеля 5T в настоящее время варьирует. В табл. 2 отдельно представлены данные о частоте аллеля 5T (без уточнения TG-повторов) и частоте аллелей 5T-12/13TG. Частота аллеля 5T варьировала от 3,1% до 6,5%. При нормозооспермии и близкой к ней группе «Нормо/патоспермия» частота аллеля 5T была 4,7 и 4,3% и достоверно не отличалась от групп с нарушениями параметров эякулята. Тенденция к более низкой частоте 5T-аллеля обнаружена в группе олигозооспермии, более высокой — в группе азооспермии. Достоверными были отличия азооспермии от олигозооспермии и группы с неизвестными параметрами эякулята. При анализе только аллельных вариантов 5T-12/13TG выявлена тенденция к несколько повышенной их частоте при азооспермии и тяжелой олигозооспермии. Однако эти различия не достигли порога достоверности. В случае анализа мутаций вместе с аллелями 5T-12/13TG группа азооспермии достоверно отличалась от всех остальных групп.

Среди обследованных нами пациентов только 10 мужчин с азооспермией имели диагноз ВДОСП: шесть пациентов из числа мужчин с двумя мутациями (F508del/R117H (3), F508del/L138ins, F508del/5T-12TG, CFTRdele2,3(21kb)/5T-12TG), два пациента с одной мутацией F508del, и два пациента, у которых мутации не были выявлены (IVS8 7T/7T).

Супружеским парам, в которых у мужчины выявлена одна или две мутации гена *CFTR*, было рекомендовано генетическое консультирование и тестирование мутаций у супруги. В большинстве случаев такое обследование было проведено, но точные данные приведены для случаев компанудных генотипов у мужчины (табл. 3). Женщинам предлагали тестирование на расширенную

Таблица 2

Частота мутаций (%) гена *CFTR* в группах мужчин с различными параметрами эякулята

Спермограмма (заключение)		Аллели								
		Все	m		5T-12/13TG		m*		5T	
		N	N	%	N	%	N	%	N	%
1	Азооспермия	768	37	4,82	12	1,56	49	6,38	50	6,51
			$P_{2,3,5,6,7}<0,001$ $P_4<0,01$				$P_{2-7}<0,001$		$P_3<0,01$ $P_7<0,05$	
2	Тяж. олигозоосп.	664	4	0,60	11	1,66	15	2,26	32	4,82
3	Олигозоосп.	552	7	1,27	2	0,36	9	1,63	17	3,08
4	Астенозоосп.	418	6	1,44	1	0,24	7	1,67	22	5,26
5	Нормо/патосп.	648	5	0,62	6	0,93	11	1,70	28	4,32
6	Нормозоосп.	574	5	1,05	4	0,70	9	1,57	27	4,70
7	н/д	668	6	0,90	8	1,20	14	2,10	25	3,74
	Всего	4292	70	1,63	44	1,03	114	2,66	201	4,68
Примечание. m — мутантные аллели, за исключением 5T-12/13TG, m* — мутантные аллели, включая 5T-12/13TG; 5T — все аллели 5T, независимо от TG-повторов.										

панель из 38 мутаций гена *CFTR*, однако большинство давали согласие только на менее затратный тест из 16 мутаций.

При компаундных генотипах у мужчины нами было проанализировано лечение бесплодия в супружеской паре и его исходы. В 8 из 12 случаев лечение проводилось в КЦРМ, эти клинические случаи представлены в табл. 3.

Во всех случаях лечение проводилось с использованием методов ВРТ, поскольку все мужчины были с азооспермией. В одном клиническом случае (табл. 3, случай 6) аллель 5T-12TG стал известен после ретроспективного исследования. Все женщины были обследованы на носительство мутаций гена *CFTR* (три женщины об-

следованы на 38 мутаций, остальные — на 16). Выявлено, что ни одна из женщин не была носительницей, поэтому генетический риск оценивался как низкий, преимплантационную генетическую диагностику (ПГД) МВ не проводили. Всего в табл. 3 представлено 13 лечебных циклов ЭКО-ИКСИ и 2 случая искусственной инсеминации (ИИ) для 8 супружеских пар. По одной попытке ВРТ было в трех случаях, по две — также в трех и по три — в двух.

Биопсию яичек проводили до начала лечения и во всех случаях сопровождали криоконсервацией биопсийного материала. При исследовании ткани яичка во всех случаях найден интактный сперматогенез и получены тестикулярные сперматозоиды в приемлемом для

Таблица 3

Клинические случаи лечения бесплодия в программах ВРТ для супружеских пар с компаундным генотипом по мутациям гена *CFTR* у мужа

№ к/с	Коды ДНК	Генотипы мужа, жены	Эяк./Биоп.	ВРТ							Исходы		
				№	Год	Программа	Фол	МII	2PN	ПЭ	ХГ	УЗИ	Роды
1	P854 P916	F508del/ R117H, -/-	0/ИС	1	2008	ЭКО-ИКСИ с ТС	21	13	3	3	Пол.	1	38 нед., мальчик 3600 г
2	P1221 P1252	F508del/ R117H, -/-	0/ИС	1	2008	ЭКО-ИКСИ с ТС	37	17	11	3	Отр.		
				2	2015	ЭКО-ИКСИ с ТС	5	1	0	От-мена			
				3	2015	ЭКО-ИКСИ с ТС ПРЭ ПРЭ	26	10	5	1 2 1	Отр. Пол. Пол.	1* 1	40 нед., мальчик
3	P1233 P1276	F508del/ R117H -/-	0/ИС	1	2009	ЭКО-ИКСИ с ТС, СГЯ	42	23	6	4	Пол.	3*	40 нед., девочка 3700 г
				2	2012	ЭКО-ИКСИ с ТС	11	7	5	2	Пол.	1	40 нед., мальчик 4300 г
4	P1404 P5213	F508del/ R117H -/-	0/ИС	1	2013	ИИ с ДС					Отр.		
				2	2013	ИИ с ДС					Отр.		
				3	2015	ЭКО-ИКСИ с ТС	13	11	10	2	Пол.	1	39 нед., мальчик
5	P968 P976	F508del/ L138ins -/-	0/ИС	1	2008	ЭКО-ИКСИ с ТС/ДС	24	16	8	2	Пол.	1	39 нед., девочка 3600 г
6	P415 P893	F508del/ 5T-12TG -/-	0/ИС	1	2009	ЭКО-ИКСИ с ТС	15	7	2	2	Отр.		
				2	2013	ЭКО-ИКСИ с ДС	10	6	3	2	Пол.	2	35 нед., девочка 2380 г и мальчик 2680 г
7	P6889 P8256	G542X/5 T-12TG -/	0/ИС	1	2015	ЭКО-ИКСИ с ТС	5	2	2	2	Отр.		
8	P7577 P7588	N1303K/ 5T-12TG -/-	0/ИС	1	2015	ЭКО-ИКСИ с ТС/ДС	20	14	6	2	Отр.		
				2	2015	ЭКО-ИКСИ с ТС	20	14	6	2	Пол.	2	КПП, к/сеч., 29 нед., два мальчика 1500 г

Примечание. № к/с — номер клинического случая, «-/-» — нормальный аллель в отношении исследованных мутаций, № — номер попытки ВРТ, 2PN — число зигот с двумя пронуклеусами, ДС — донорские сперматозоиды, ИИ — искусственная инсеминация, КПП — краевое приращение плаценты, к/сеч — родоразрешение с применением кесарева сечения, МII — число зрелых ооцитов, ПЭ — число эмбрионов, перенесенных в полость матки, ПРЭ — число размороженных эмбрионов, перенесенных в полость матки, СГЯ — синдром гиперстимуляции яичников, ТС — тестикулярные сперматозоиды, УЗИ — ультразвуковое исследование: 1* — одноплодная беременность (1* — нет сердцебиения у плода), 2 — двуплодная, 3* — тройня с анэмбрионией двух плодов, Фол — число фолликулов, ХГ — биохимический тест на беременность по уровню хорионического гонадотропина. Эяк./Биоп. — анализ сперматозоидов в эякуляте (0 — азооспермия) и биоптате (ИС — интактный сперматогенез).

ИКСИ количестве и качестве. Тем не менее, в некоторых случаях по решению супружеской пары и врача были использованы донорские сперматозоиды.

Для стимуляции суперовуляции в лечебных циклах ЭКО-ИКСИ использованы разные протоколы (длинный или короткий, короткий с антагонистами), которые определялись, прежде всего, показаниями со стороны пациентки. Во всех случаях было получено достаточное число фолликулов и яйцеклеток, за исключением одного лечебного цикла, в котором получена только одна яйцеклетка и не было оплодотворения (табл. 3, случай 2, попытка 2). В одном из лечебных циклов (табл. 3, случай 3) возникло осложнение в виде СГЯ. В случае использования собственных тестикулярных сперматозоидов средний процент оплодотворения составил 45,7%, в случае донорских или тестикулярных и донорских — 65,9%.

В полость матки переносили, преимущественно, по два эмбриона. В 2008—2009 гг. переносили три или четыре эмбриона, что на тот момент считалось приемлемым. Перенос размороженных эмбрионов проводился у одной из супружеских пар. Наступление клинической беременности завершившейся родами, было достигнуто в 7 из 8 супружеских пар, что составило 87,5%. Данные о родах, поле и весе новорожденного также представлены в табл. 3. С первой попытки ЭКО-ИКСИ беременностью и родами закончилось лечение для двух супружеских пар (табл. 3, случаи 1 и 5). Для одной из супружеских пар успешная беременность была достигнута только в третьей попытке ЭКО-ИКСИ после второго переноса размороженных эмбрионов (табл. 3, случай 2). Частота наступления беременности (ЧНБ) на начатый лечебный цикл по данным УЗИ-диагностики составила 53,3%. В расчете на перенос эмбрионов ЧНБ была 64,3% (отмена переноса была в одном лечебном цикле).

В пяти семьях беременность достигнута с использованием собственных тестикулярных сперматозоидов, в одной — с использованием донорских сперматозоидов, и в двух — с использованием донорских и тестикулярных сперматозоидов. Супружеская пара P1404/P5213 (табл. 3, случай 4) прошла два лечебных цикла искусственной инсеминации донорскими сперматозоидами с отрицательным результатом. Впоследствии они приняли решение о проведении тестикулярной биопсии для использования собственных сперматозоидов в программе ЭКО-ИКСИ. Было получено достаточное число эмбрионов хорошего качества. В результате переноса двух эмбрионов наступила одноплодная беременность, и родился здоровый мальчик. Другая супружеская пара (табл. 3, случай 6) напротив, после проведения ЭКО-ИКСИ с тестикулярными сперматозоидами с отрицательным исходом, совместно с врачом приняла решение об использовании донорских сперматозоидов. В результате переноса двух эмбрионов наступила двуплодная беременность, которая закончилась рождением здоровых девочки и мальчика.

В двух лечебных циклах (табл. 3, случаи 5 и 8) было принято решение об использовании для оплодотворения в ИКСИ донорских сперматозоидов для части яйцеклеток, для другой части — собственных тестикулярных. В результате, в паре P968/P976 наступила беременность в первой попытке и успешно завершилась родами. В паре P7577/P7588 беременность не наступила. Поскольку в данном клиническом случае качество оплодотворения было удовлетворительным, во второй попытке использовались только собственные тестикулярные сперматозоиды. После переноса двух эмбрионов, наступила двуплодная беременность, которая завершилась кесаревым сечением в 29 недель вследствие краевого прилегания плаценты. Два мальчика родились с весом 1500 г. На июнь 2017 г. состояние их здоровья уточнялось, и было подтверждено, что они здоровы.

Обсуждение

Большинство мужчин из супружеских пар с бесплодием направляется на анализ мутаций гена *CFTR* в связи с мужским фактором. В действительности, когда диагноз при направлении не указан, сложно выделить случаи, где мужской фактор бесплодия действительно имел место. Все пациенты могут проходить скрининг носительства при планировании беременности. Анализ параметров эякулята, проведенный в нашем исследовании, позволил разделить пациентов на группы в зависимости от типа нарушений спермограммы. Нами изучено 768 хромосом пациентов с азооспермией, 664 — тяжелой олигозооспермией, 552 — олигозооспермией, 418 — астенозооспермией, 574 — нормозооспермией; 648 хромосом принадлежали пациентам, отнесенным к группе нормо/патоспермии и для 668 — к группе с отсутствием данных о параметрах эякулята (табл. 2). Эти данные не отражают соотношение нормо- и разных форм патоспермии при мужском бесплодии, а только характеризуют пациентов направленных на анализ, вошедших в состав данного исследования. Азооспермия наблюдалась у 17,9% обследованных, в то время как среди мужчин с бесплодием ее частота составляет, по данным литературы 8—15% [10]. Разделение пациентов на группы в зависимости от количества и подвижности сперматозоидов по данным спермограммы имеет определенную долю условности, поскольку индивидуальные параметры спермограммы могут варьировать. Мы не выделяли группу тератозооспермии, поскольку в связи с изменением правил выявления аномальных сперматозоидов, привести данные к одной системе было сложно. Обследованные нами пациенты с нормозооспермией могли быть как фертильны, так и быть с идиопатическим бесплодием.

Пациенты с азооспермией достоверно отличались от пациентов с другими нарушениями спермограммы и с нормозооспермией более высокой частотой мутаций ге-

на *CFTR* (4,8%). Для других групп частота мутаций не отличалась от группы с нормозооспермией и составила 0,6—1,4%. Только при азооспермии найдены генотипы с двумя мутациями гена *CFTR*. Полученные нами данные не подтверждают мнение об ассоциации мутаций гена *CFTR* с иными типами патоспермии, кроме азооспермии. На основании анализа носителей одной мутации в группе с азооспермией мы проверили предположение о том, что среди них могут оставаться компаунды со второй невыявленной мутацией. Однако различие группы пациентов с азооспермией с другими группами по числу лиц с одной мутацией не было достоверным.

В спектре выявленных нами мутантных генотипов преобладали генотипы, несущие мутации F508del и 5T-12/13TG. Это согласуется с данными других авторов по спектру мутаций гена *CFTR*, характерных для мужского бесплодия, ассоциированного с ВДОСП, хотя во многих работах принимаются во внимание все аллели 5T без детализации TG-повторов [3, 6, 16]. Данные по носителям мутаций, представленные в табл. 1, расположены в порядке убывания частоты встречаемости случаев с мутациями и могут отчасти служить отражением спектра мутаций, характерного для мужского бесплодия. Третье место в спектре мутаций при ВДОСП по данным литературы принадлежит мутации R117H [3, 6]. По нашим данным, третье место занимают сопоставимые частоты генотипов с мутациями L138ins и R117H. При этом у носителей данных мутаций азооспермия была в 75—80%, что также вызывает предположение о возможной второй, не выявленной мутации.

У четырех мужчин с проблемами фертильности найдена «славянская» мутация CFTRdele2,3(21kb), которая редко входит в спектр мутаций в зарубежных исследованиях. Мужчина с компаундным генотипом CFTRdele2,3(21kb)/5T-12TG был с диагнозом ВДОСП. Носители мутации CFTRdele2,3(21kb) были с олиго-, астено- и нормозооспермией, что, наиболее вероятно, характеризует совпадение носительства и бесплодия в супружеской паре, поскольку эта мутация вторая по частоте в России [12]. Найдены три случая носительства мутации R334W, два — 394delTT и по одному — G542X, N1303K, W1282X и R347P. Носители тяжелых мутаций G542X, N1303K и W1282X были с азооспермией. Возможность совпадения азооспермии и носительства мутации гена *CFTR* подтверждается описанными нами случаями микроделеции локуса AZFc и синдрома Клайнфельтера у носителей мутаций гена *CFTR*.

В нашем исследовании мы не исключали из числа обследованных мужчин носителей других генетических нарушений, чтобы определить распространенность мутаций гена *CFTR* в группе пациентов с определенным нарушением параметров эякулята в целом. Микроделеции Y-хромосомы также выявлены и у пациентов без мутаций гена *CFTR*, вошедших в состав данного исследования. Это свидетельствует о том, что на диагностику

мутаций гена *CFTR*, направляются пациенты как с obstructивной, так и необstructивной азооспермией.

Возможность диагностики патогенетического варианта 5T имеет важное значение для выявления второй мягкой мутации в генотипе. Без этого 7 из 12 компаундов, выявленных в настоящем исследовании, были бы отнесены к категории носителей. Это, соответственно, повысило бы неопределенность диагностики. В нашем исследовании для большинства образцов использована панель из 16 мутаций и анализ аллеля 5T гена *CFTR*. Для небольшого числа образцов исследованы 32 мутации, однако дополнительных мутаций гена *CFTR* не выявлено.

С началом исследования поли-T-полиморфизма интрона 8 мы столкнулись с относительно высокой распространенностью аллеля 5T. Кроме того, нам встретились случаи фертильных мужчин с 5T в компаунде с тяжелой мутацией. Так, в одной из семей с MB (случай, не включенный в настоящее исследование) у отца ребенка с MB (гомозиготного по мутации F508del) обнаружен компаундный генотип F508del/5T. Впоследствии мы проанализировали аллель 5T этого мужчины и выявили сцепление с 11-ю повторами TG. Кроме того, в ходе исследования были найдены нормальные количественные показатели эякулята у гомозиготного по аллелю 5T мужчины и у компаунда 5T и другой мутации (случай описаны в разделе результатов настоящего исследования).

По нашим данным, частота аллеля 5T без дифференцировки по повторам TG, была несколько выше при азооспермии, но достоверно отличалась только от группы олигозооспермии и группы с отсутствием данных по параметрам эякулята. Повышенная частота аллеля 5T по данным литературы, выявляется, преимущественно, для лиц с ВДОСП [2, 3]. С целью дифференцировки аллелей 5T, мы использовали разработанный нами подход молекулярного гаплотипирования локуса для анализа TG-повторов, сцепленных с аллелем 5T. Результаты ранее проведенных исследований свидетельствуют о том, что чаще аллель 5T сцеплен с повторами 11TG (80,9%) [14]. По данным литературы, аллельный вариант 5T-11TG относят к мутациям, не имеющим клинического проявления, однако пока интерпретируют с осторожностью, не исключая его роли в развитии *CFTR*-связанных заболеваний [12, 17]. Варианты 12TG и 13TG в сцеплении с 5T рассматривают в качестве патогенетически значимых аллелей [5, 6, 12, 17]. Среди носителей в 33 случаях мы выявили аллель 5T-12TG и в 4-х случаях — 5T-13TG. В литературе имеются сведения о большей тяжести аллеля 5T-13TG [17].

В нашем исследовании распределение вариантов 5T-12/13TG обнаружило тенденцию к более высокой частоте при азооспермии и тяжелой олигозооспермии, однако не достигло порога достоверности с учетом поправки Йетса. Исходя из полученных нами данных, представляется, что влияние аллеля 5T, сложнее, чем предполагалось изначально. С учетом того, что все ком-

паундные варианты 5T-12TG найдены только при азооспермии, можно полагать, что наши данные поддерживают представление о патогенетической значимости только аллеля 5T-12TG. В рекомендациях E. Dequeker с соавт. (2009) изложен подробный алгоритм исследования гена *CFTR*, включая анализ аллеля 5T с последующим анализом TG-повторов [5]. В то же время отдельные руководства отмечают необходимость осторожной интерпретации аллеля 5T ввиду клинической неопределенности [8].

В литературе встречаются данные о том, что мутация R117H может быть сцеплена с аллелем 5T либо 7T, что важно для интерпретации генотипа в связи с возможным цис-положением R117H и 5T [1, 5, 8]. В нашем исследовании, все аллели с мутацией R117H (N = 8) были сцеплены с аллелем 7T. В настоящем исследовании отмечено сцепление мутации F508del с аллелем 9T интрона 8, которое подтверждается данными литературы и собственных исследований [1, 18].

Выявление мутаций гена *CFTR* при планировании естественной беременности или полученной с применением методов ВРТ, имеет важное значение для медико-генетического консультирования супружеской пары. Так, пациенты с азооспермией, прежде всего обструктивной, должны быть информированы о повышенном риске носительства мутаций гена *CFTR*, необходимости обследования мужчины и супруги, в случае носительства у мужчины. Для пациентов с ВДОСП, очевидно, необходимо тестирование на расширенный, специфический спектр мутаций. Даже в случае, если при ВДОСП найдена только одна мутация или мутации не идентифицированы, риск МВ должен приниматься во внимание. Если обструктивный или необструктивный тип азооспермии не определен, то, возможно, целесообразно ступенчатое исследование сначала кариотипа и микроредупликаций Y-хромосомы, затем анализ гена *CFTR*.

Для определения генетического риска в отношении определенной клинической формы заболевания и выбора метода профилактики МВ значимой является тяжесть выявленных мутаций. Даже если при высоком генетическом риске МВ супружеская пара хочет иметь ребенка, надо дать ей возможность решить вопрос самостоятельно [2]. В то же время в отношении «мягких» мутаций рекомендации для пренатального или преимплантационного тестирования должны быть проработаны. Несмотря на важность выявления «мягких» мутаций при обструктивной азооспермии, возможность их анализа у эмбриона и плода на наш взгляд, необходимо ограничить, как минимум, рекомендательно. Так, по нашему мнению, ПГД в отношении аллеля 5T, особенно без уточнения TG-повторов, с позиций современных представлений, рекомендовать и проводить не следует.

Среди обследованных нами мужчин с азооспермией, диагноз ВДОСП был только у 10 пациентов. Из числа мужчин с компаундным генотипом 50% были с диагнозом ВДОСП. Некоторым из них такой диагноз был по-

ставлен после выявления генотипа. Данные литературы свидетельствуют о том, что генотип F508del/R117H типичен для ВДОСП [6]. Однако у одного из наших пациентов с таким генотипом, диагноза ВДОСП не было. Очевидно, что диагностика ВДОСП вызывает затруднения. В связи с этим необходимо отметить важность привлечения более точных маркеров ВДОСП, помимо генетических.

При обследовании пациентов с ВДОСП, по данным других авторов, у некоторых мужчин выявляются повышенные значения потового теста на хлориды, сниженные показатели объема форсированного выдоха, рецидивирующие бронхо-легочные заболевания, нарушение функции поджелудочной железы и в отдельных случаях ставится диагноз мягкой формы МВ [16]. Такие пациенты должны быть направлены для консультирования к специалистам в области муковисцидоза. Генетическое консультирование для пациентов с ВДОСП обязательно. При определении метода лечения бесплодия, необходимо учитывать, что хирургическая реконструкция семенных протоков при ВДОСП и МВ не рекомендована [2].

До недавнего времени такие тяжелые формы мужского бесплодия как азооспермия, служили фактором абсолютного бесплодия. К настоящему времени опубликованы результаты лечения бесплодия при ВДОСП методом ЭКО-ИКСИ с эпидидимальными или тестикулярными сперматозоидами, которые в целом свидетельствуют о хороших результатах в отношении частоты оплодотворения и наступления беременности [4, 19]. В то же время, встречаются сведения о повышении частоты прерывания беременности в лечебных циклах в случае ВДОСП [20].

В настоящем исследовании были проанализированы лечебные циклы ВРТ у пациентов с выявленными нами компаундными генотипами, проходивших лечение бесплодия у нас в центре. Хотя описанные клинические случаи представляют собой маленькую выборку, они отражают работу многих специалистов КЦРМ и свидетельствуют о достаточно высокой результативности проведенного лечения. Важным аспектом является то, что сперматогенез у всех пациентов был сохранен и использование собственных тестикулярных сперматозоидов достаточно эффективно. В литературе имеются сведения о том, что у 12–35% пациентов с ВДОСП сперматогенез может быть ослаблен [21]. В проанализированных нами клинических случаях, процент оплодотворения и частота наступления беременности были не хуже, чем в среднем для ЭКО и ИКСИ. Так, согласно отчетным данным регистра ВРТ в России, в программе ЭКО частота наступления беременности в 2014 году составила 31,5% в расчете на цикл и 38,4% — на перенос эмбрионов. В программе ИКСИ эти показатели составили соответственно 27% и 34,9% [22].

В описанных нами клинических случаях у женщин был достаточно хороший ответ на стимуляцию. Одна-

ко известно, что этот показатель зависит от возраста женщины, поэтому таким супружеским парам может быть рекомендовано не откладывать планирование беременности с использованием программы ЭКО-ИКСИ. Кроме того, имеются сведения о негативном влиянии возраста мужчины с ВДОСП на количество и качество сперматозоидов, получаемых хирургическим путем и исходы лечения бесплодия в супружеской паре с использованием ЭКО-ИКСИ [19]. У некоторых супружеских пар получение беременности было особенно сложным. Так, у супружеской пары из описанных нами клинических случаев беременность, успешно завершившаяся родами, наступила только после второго переноса размороженных эмбрионов в третьей попытке ЭКО-ИКСИ (табл. 3, случай 2) Тем не менее, эта пара реализовала свои шансы на рождение генетически родного ребенка при азооспермии у мужа. Использование криоконсервации тестикулярной ткани и эмбрионов, оставшихся после переноса, позволяет максимально использовать шансы пациентов на получение беременности.

В литературе встречаются рекомендации о необходимости обследования на мутации *CFTR* всех пациентов перед ЭКО-ИКСИ или всех супружеских пар с бесплодием [5, 23]. Так, в исследовании L.C. Wong с соавт. (2004) описывается клинический случай рождения детей с МВ в результате ЭКО-ИКСИ. В исследовании указано, что у мужчины был синдром ВДОСП, однако анализ мутаций гена *CFTR* не проводился [23]. По нашему мнению, с позиций современных представлений, этот клинический случай свидетельствует именно о том, что для пациентов с ВДОСП ДНК-диагностика мутаций МВ должна быть обязательной. В отношении всех пациентов с бесплодием необходимы доказательные данные в отношении риска МВ. Результаты нашего исследования показывают, что азооспермия действительно является группой риска в отношении носительства мутаций и в условиях недостаточного выявления ВДОСП или обструктивной азооспермии, для всех пациентов с азооспермией может быть рекомендован анализ мутаций гена *CFTR*. Для всех остальных мужчин с бесплодием, анализ мутаций гена *CFTR* важен, вероятно, в такой же степени, как и других супругов, планирующих беременность. В то же время обследованные нами пациенты с нормозооспермией не вполне отражают фертильных мужчин. Вероятно, необходимы более масштабные сравнительные исследования мужчин с нормозооспермией фертильных и из супружеских пар с бесплодием мужчин с использованием соответствующей панели мутаций.

В нашем центре зафиксирован случай рождения ребенка с МВ в результате лечения бесплодия методом ЭКО-ИКСИ, который не описан в разделе результатов, поскольку мужского фактора бесплодия в данном клиническом случае не было. Супружеская пара (женщине 29 лет, супругу 27 лет) проходила обследование

и лечение в КЦРМ в связи с бесплодием, обусловленным трубно-перитонеальным фактором. У мужчины показатели эякулята в пределах нормативных значений: объем 4 мл, общая концентрация сперматозоидов — 81 млн/мл, процент прогрессивно-подвижных — 37%, аномальных — 62%. Обследование на носительство частых мутаций гена *CFTR* предлагается всем супружеским парам, однако остается на усмотрение пациентов и в данном случае не проводилось. В первом лечебном цикле ЭКО в 2012 г. пациентка была снята с цикла в связи с отсутствием роста фолликулов. Во втором лечебном цикле ЭКО-ИКСИ в 2013 г были перенесены два эмбриона, наступила одноплодная беременность, посредством кесарева сечения родилась девочка. Впоследствии у ребенка обнаружен МВ и генотип F508del/CFTRdele2,3(21kb). Эти мутации были бы обнаружены у супругов, поскольку входят в состав панели при тестировании на частые мутации МВ в КЦРМ (с 2004 г.). С учетом того, что нам известен только единственный такой случай, ребенок с МВ родился один на 4500 детей, рожденных в результате лечения бесплодия в КЦРМ (число известных исходов беременностей с учетом данных о здоровье рожденных детей за этот период времени), данный единственный случай не позволяет судить о превышении популяционной частоты МВ в России. Частота МВ для европеоидов оценивается примерно как 1:2500 [1]. По данным неонатального скрининга, частота МВ в России (2007—2012 гг.) составляет 1 на 10296 новорожденных [24].

Описанный клинический случай, полученные нами данные в отношении мужского бесплодия, в совокупности с данными о распространенности МВ в России, свидетельствует о том, что носителем мутации гена *CFTR* может оказаться как фертильный мужчина, так и мужчина с бесплодием. В связи с этим предоставление соответствующего консультирования и лабораторных исследований по скринингу носительства должны эффективно работать. При этом азооспермия должна служить показанием для тестирования.

Таким образом, анализ результатов проведенных нами исследований, позволяет заключить, что мужчинам с обструктивной азооспермией, а возможно, и всем мужчинам с азооспермией необходимо проводить генетическое консультирование и анализ мутаций гена *CFTR*. При тестировании важно применять адаптированную панель мутаций, включающую мягкие мутации и, в том числе, дифференцированную диагностику аллеля 5T-12/13TG. В свою очередь, у мужчин с азооспермией при выявлении мутации(й) гена *CFTR* важно провести тщательное обследование на предмет ВДОСП и мягких проявлений МВ. Мужчины с азооспермией, имеющие компаундный генотип по мутациям гена *CFTR*, имеют хорошие шансы успешной программы ЭКО-ИКСИ с использованием собственных тестикулярных сперматозоидов.

Список литературы

1. Ивашенко ТЭ, Баранов ВС. Биохимические и молекулярно-генетические основы патогенеза муковисцидоза. Интермедика, Санкт-Петербург. 2002:256.
2. Андрология. Мужское здоровье и дисфункция репродуктивной системы. Под ред. Нишлага Э, Бере ГМ. Медицинское информационное агентство. 2005:554.
3. Claustres M. Molecular pathology of the CFTR locus in male infertility. *Reproductive BioMedicine Online*. 2005;10(1):14-41.
4. Phillipson GTM, Petrucco OM, Matthews CD. Congenital bilateral aplasia of the vas deferens, cystic fibrosis mutation analysis and intracytoplasmic sperm injection. *Human Reproduction*. 2000; 15(2):431-435.
5. Dequeker E, Stuhmann M, Morris M et al. Best practice guidelines for molecular genetic diagnosis of cystic fibrosis and CFTR-related disorders — updated European recommendations. *European Journal of Human Genetics*. 2008:1-15.
6. Yu J, Chen Z, Ni Y, Li Z. CFTR mutations in men with congenital bilateral absence of the vas deferens (CBAVD): a systemic review and meta-analysis. *Human Reproduction*. 2012; 27(1):25-35.
7. Yu J, Chen Z, Zhang T. et al. Association of genetic variants in CFTR gene, IVS8 c.1210-12T[5_9] and c.1210-35_1210-12GT[8_12], with spermatogenic failure: case-control study and meta-analysis. *Molecular Human Reproduction*. 2011; 17(9):594-603.
8. Technical Standards and Guidelines for CFTR Mutation Testing. American College of Medical Genetics. 2011. http://www.acmg.net/docs/CFTR_Mutation_Testing_2011.pdf
9. Diagnostic evaluation of the infertile male: a committee opinion. Practice Committee of the American Society for Reproductive Medicine Fertility and Sterility. 2015; 103(3):e18-e25.
10. Male Infertility. Diagnosis and Treatment. Ed. Oehninger S.C., Kruger T.F. Informa Healthcare 2007:468.
11. Mocanu E, Shattock R, Barton D et al. All azoospermic males should be screened for cystic fibrosis mutations before intracytoplasmic sperm injection. *Fertility and Sterility*. 2010; 94(6):2448-5240.
12. Петрова НВ, Кондратьева ЕИ, Красовский СА и др. Проект национального консенсуса «Муковисцидоз: определение, диагностические критерии и терапия». Раздел «Генетика муковисцидоза. Молекулярно-генетическая диагностика при муковисцидозе». Медицинская генетика. 2016;15(11):29-43.
13. Chen H, Ruan YC, Xu WM et al. Regulation of male fertility by CFTR and implications in male infertility. *Human Reproduction Update*. 2012; 18(6):703-713.
14. Маркова ЕВ, Татару ДА, Преда ОГ. Фрагментный анализ полиморфизма (TG)mTn интрона 8 гена CFTR. Медицинская генетика. 2017;16(1):11-19.
15. Руководство ВОЗ по исследованию и обработке эякулята человека. Пятое издание (2010). Капитал принт. 2012:291.
16. Josserand RN, Bey-Omar F, Rollet J et al. Cystic fibrosis phenotype evaluation and paternity outcome in 50 males with congenital bilateral absence of vas deferens. *Human Reproduction*. 2001; 16(10):2093-2097.
17. Castellani C, Cuppens H, Macek M. Consensus on the use and interpretation of cystic fibrosis mutation analysis in clinical practice. *Journal of Cystic Fibrosis*. 2008; 7:179-196.
18. Маркова Е.В., Татару Д.А. STR-маркеры хромосом, несущих мутации F508del и CFTRdele2,3(21kb) гена CFTR. Медицинская генетика. 2017; 16(6):9-20.
19. Elhanbly S, El-ASied A, Fawzy M et al. Relationship of paternal age with outcome of percutaneous epididymal sperm aspiration — in intracytoplasmic sperm injection, in cases of congenital bilateral aplasia of the vas deferens. *Fertility and Sterility*. 2015; 104(3):602-606.
20. Lu S, Cui Y, Zhang H et al. Association of cystic fibrosis transmembrane-conductance regulator gene mutation with negative outcome of intracytoplasmic sperm injection pregnancy in cases of congenital bilateral absence of vas deferens. *Fertility and Sterility*. 2014; 101(5):1255-1260.
21. Llabador MA, Pagin A, Lefebvre-Maunoury C et al. Congenital bilateral absence of the vas deferens: the impact of spermatogenesis quality on intracytoplasmic sperm injection outcomes in 108 men. *Andrology*. 2015; 3:473-480.
22. Регистр ВРТ. Отчет за 2014 год. http://www.rahr.ru/d_registr_otchet/registr_BRT_RARCH16.pdf
23. Wong LC, Alper O, Hsu A et al. The necessity of complete CFTR mutation analysis of an infertile couple before in vitro fertilization. *Fertility and Sterility*. 2004; 82(4):947-949.
24. Шерман ВД, Капранов НИ, Каширская НЮ, Кондратьева ЕИ. Роль неонатального скрининга в оптимизации медицинской помощи больным муковисцидозом в России. Медицинская генетика. 2013; 12(11):24-28.