



ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА
ПО ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ

(51) МПК

G01N 33/58 (2006.01)

C12Q 1/6806 (2018.01)

C12Q 1/6827 (2018.01)

C12Q 1/686 (2018.01)

C12Q 1/6869 (2018.01)

C12Q 1/6876 (2018.01)

C12Q 1/6883 (2018.01)

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ

(52) СПК

G01N 33/582 (2023.05); C12Q 1/6806 (2023.05); C12Q 1/6827 (2023.05); C12Q 1/686 (2023.05); C12Q 1/6869 (2023.05); C12Q 1/6876 (2023.05); C12Q 1/6883 (2023.05)

(21)(22) Заявка: 2022131708, 06.12.2022

(24) Дата начала отсчета срока действия патента:
06.12.2022

Дата регистрации:
21.07.2023

Приоритет(ы):

(22) Дата подачи заявки: 06.12.2022

(45) Опубликовано: 21.07.2023 Бюл. № 21

Адрес для переписки:

450008, г. Уфа, ул. Ленина, 3,
БАШГОСМЕДУНИВЕРСИТЕТ, пат. отд.,
Ахатов Искандер Шаукатович

(72) Автор(ы):

Галимова Эльмира Фанисовна (RU),
Галимова Саида Шамилевна (RU),
Мочалов Константин Сергеевич (RU),
Галимов Шамиль Нариманович (RU),
Громенко Юлия Юрьевна (RU),
Громенко Дмитрий Сергеевич (RU),
Громенко Иван Дмитриевич (RU),
Громенко Дарья Дмитриевна (RU),
Галимов Камиль Шамилевич (RU),
Бодрова Елизавета Сергеевна (RU),
Муратов Эмиль Марсельевич (RU),
Гилязова Ирина Ришатовна (RU),
Павлов Валентин Николаевич (RU)

(73) Патентообладатель(и):

Федеральное государственное бюджетное
образовательное учреждение высшего
образования "БАШКИРСКИЙ
ГОСУДАРСТВЕННЫЙ
МЕДИЦИНСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ"
Министерства здравоохранения Российской
Федерации (RU)

(56) Список документов, цитированных в отчете
о поиске: RU 2314530 C1, 10.01.2008. RU
2665162 C1, 28.08.2018. WO 2018092170 A1,
24.05.2018. SALEH JAWEESH M. et al.
Association between the single nucleotide variants
of the mitochondrial cytochrome B gene (MT-
CYB) and the male infertility. Mol Biol Rep. 2022
May; 49(5): 3609-3616. Epub 2022 Feb 3.

(54) СПОСОБ ПРОГНОЗИРОВАНИЯ ИДИОПАТИЧЕСКОГО МУЖСКОГО БЕСПЛОДИЯ НА
ОСНОВЕ АНАЛИЗА НУКЛЕОТИДНЫХ ВАРИАНТОВ В ГЕНЕ МИТОХОНДРИАЛЬНОГО
ЦИТОХРОМА В

(57) Реферат:

Изобретение относится к медицине, а именно
к андрологии, репродуктологии и генетике, и
может быть использовано для прогнозирования
идиопатического мужского бесплодия. Проводят

сбор эякулята, полученного путем мастурбации,
инкубацию в термостате при 37°C, после чего
выделяют митохондриальную ДНК. Определяют
генотипы полиморфных локусов в гене

митохондриального цитохрома В (MT-CYB) с помощью метода дискриминации аллелей TaqMan. При обнаружении генотипа CC полиморфного варианта rs527236194 гена MT-CYB прогнозируют риск развития идиопатического мужского бесплодия в виде олигоастенотератоспермии

или астенотератозооспермии. Способ обеспечивает повышение точности прогноза бесплодия за счет расширения выявляемых типов патологий: олигоастенотератоспермии и астенотератозооспермии. 1 табл., 3 пр.

RU 2800406 C1

RU 2800406 C1



FEDERAL SERVICE
FOR INTELLECTUAL PROPERTY

(51) Int. Cl.

G01N 33/58 (2006.01)

C12Q 1/6806 (2018.01)

C12Q 1/6827 (2018.01)

C12Q 1/686 (2018.01)

C12Q 1/6869 (2018.01)

C12Q 1/6876 (2018.01)

C12Q 1/6883 (2018.01)

(12) ABSTRACT OF INVENTION

(52) CPC

G01N 33/582 (2023.05); C12Q 1/6806 (2023.05); C12Q 1/6827 (2023.05); C12Q 1/686 (2023.05); C12Q 1/6869 (2023.05); C12Q 1/6876 (2023.05); C12Q 1/6883 (2023.05)

(21)(22) Application: 2022131708, 06.12.2022

(24) Effective date for property rights:
06.12.2022

Registration date:
21.07.2023

Priority:

(22) Date of filing: 06.12.2022

(45) Date of publication: 21.07.2023 Bull. № 21

Mail address:

450008, g. Ufa, ul. Lenina, 3,
BASHGOSMEDUNIVERSITET, pat. otd.,
Akhatov Iskander Shaukatovich

(72) Inventor(s):

Galimova Elmira Fanisovna (RU),
Galimova Saida Shamilevna (RU),
Mochalov Konstantin Sergeevich (RU),
Galimov Shamil Narimanovich (RU),
Gromenko Iuliia Iurevna (RU),
Gromenko Dmitrii Sergeevich (RU),
Gromenko Ivan Dmitrievich (RU),
Gromenko Daria Dmitrievna (RU),
Galimov Kamil Shamilevich (RU),
Bodrova Elizaveta Sergeevna (RU),
Muratov Emil Marselevich (RU),
Giliazova Irina Rishatovna (RU),
Pavlov Valentin Nikolaevich (RU)

(73) Proprietor(s):

federalnoe gosudarstvennoe biudzhetnoe
obrazovatelnoe uchrezhdenie vysshego
obrazovaniia «BASHKIRSKII
GOSUDARSTVENNYI MEDITSINSKII
UNIVERSITET» Ministerstva
zdravookhraneniia Rossiiskoi Federatsii (RU)

(54) METHOD OF PREDICTION OF IDIOPATHIC MALE INFERTILITY BASED ON ANALYSIS OF NUCLEOTIDE VARIANTS IN MITOCHONDRIAL CYTOCHROME B GENE

(57) Abstract:

FIELD: medicine, andrology, reproductive medicine and genetics.

SUBSTANCE: invention can be used to predict idiopathic male infertility. The ejaculate obtained by masturbation is collected, incubated in a thermostat at 37°C, after which mitochondrial DNA is isolated. The genotypes of polymorphic loci in the mitochondrial cytochrome B (MT-CYB) gene are determined using the TaqMan allele discrimination method. If the CC genotype of the rs527236194 polymorphic variant of

the MT-CYB gene is detected, the risk of developing idiopathic male infertility in the form of oligoasthenoteratospermia or asthenoteratozoospermia is predicted.

EFFECT: method provides increased accuracy of infertility prediction by expanding the types of pathologies to be detected: oligoasthenoteratospermia and asthenoteratozoospermia.

1 cl, 1 tbl, 3 ex

RU 2 800 406 C1

RU 2 800 406 C1

Изобретение относится к медицине, а именно к андрологии, репродуктологии и генетике, может быть использовано для уточнения причин мужского бесплодия, а также прогноза исхода процедуры ЭКО/ИКСИ в клиниках вспомогательных репродуктивных технологий (ВРТ).

В последние два десятилетия наблюдается экспоненциальный рост исследований, посвященных различным аспектам репродуктивного здоровья мужчин [Baskaran S. et al., 2021]. Увеличение случаев бесплодия, сопровождающегося снижением качества спермы, объясняет повышенный интерес научного сообщества к этой проблеме для поиска основных причин и разработки эффективных вариантов профилактики и лечения [Лебедев Г.С., 2019; Houston B. et al., 2021]. Мужское бесплодие - многофакторная форма патологии, включающая широкий спектр расстройств [Aitken R., 2020; Павлов В.Н. и др., 2020]. В большинстве случаев причины снижения фертильности у конкретного пациента остаются неизвестными и, по различным оценкам, от 20 до 75% диагностированного мужского бесплодия считаются идиопатическими [Agarwal A. et al., 2021]. Одним из критериев диагностики мужского бесплодия является анализ спермограммы [WHO laboratory manual for the examination and processing of human semen. 5th ed. WHO (Geneva), 2010. Vol.270; Руководство ВОЗ по исследованию и обработке эякулята человека. Пер. с англ. Н.П. Макаровой под научн. ред. Л.Ф. Курило. 5-е изд. М.: Изд-во "Капитал принт", 2012]. Однако он имеет недостатки и не всегда по данному анализу можно оценить фертильность пациентов. Недостатки классической спермограммы:

1. Анализ основан лишь на визуальном исследовании функционально-морфологических критериев сперматозоидов и не дает возможность выявить биохимические и патофизиологические нарушения в мужских половых клетках.
2. Имеет субъективный характер, зависящий от лабораторных навыков лаборанта.
3. От 30 до 50% анализов спермограммы соответствуют критериям ВОЗ, что не позволяет выявить патологию при идиопатическом бесплодии у мужчин.

Многочисленные данные указывают на роль мтДНК в развитии патоспермии [Vertika S. et al., 2020; Karimian M. et al., 2020; Park Y.-J. et al., 2021 и др.].

Известен способ прогнозирования риска нарушений фертильности у мужчин с ожирением, включающий отбор венозной крови, проведение аллельспецифичной полимеразной цепной реакции с использованием флуоресцентно-меченного олигонуклеотидного зонда и анализа кривой плавления. При выявлении аллеля А полиморфных вариантов rs2414096 и rs749292 гена ароматазы CYP19A прогнозируют риск нарушения фертильности у мужчин с ожирением [патент RU 2498314, 2013].

Известен способ молекулярной диагностики генетического риска развития осложнений урогенитальной хламидийной инфекции, приводящих к нарушению репродуктивной функции, у человека, характеризующийся тем, что методом ПЦР определяют полиморфные варианты генов IL6 и TGFb1. При определении гомозиготного генотипа CC в позиции -174 гена IL6 у мужчин и женщин, а также гетерозиготного генотипа GC в позиции -915 гена TGFb1 у женщин, прогнозируют высокий риск развития осложненного клинического течения урогенитальной хламидийной инфекции [патент RU 2535724, 2014].

Известен способ прогнозирования идиопатического бесплодия у мужчин, включающий определение концентрации термостабильной карбоксиэстеразы в семенной плазме методом латекс-агглютинации в начале исследования и через 4-6 недель. Далее по сумме концентраций двух определений выше 16,0 нг/мл прогнозируют идиопатическое бесплодие [патент RU 2697395, 2019].

Наиболее близким аналогом изобретения является способ прогнозирования нарушения фертильности у мужчин в виде астенозооспермии, заключающийся в том, что исследуют периферическую кровь. На выделенной из лимфоцитов ДНК амплифицируют фрагменты генов глутатион-8-трансфераз M1 и P1. При выявлении одного из генотипов GSTM1 0/0, GSTP1 B/B, GSTP1 B/C и GSTP1 C/C прогнозируют риск развития астенозооспермии. Использование способа позволяет проводить раннее прогнозирование астенозооспермии в начале репродуктивного периода онтогенеза и, соответственно, своевременный комплекс профилактических мероприятий [патент RU 2314530, 2008]. Недостатком прототипа является то, что он выявляет только

диагностические маркеры астенозооспермии (низкая подвижность сперматозоидов), но не прогнозирует риск развития идиопатического мужского бесплодия при олигозооспермии (низкая концентрация жизнеспособных сперматозоидов) и тератозооспермии (сперматозоиды с измененной морфологией).

Задачей изобретения является разработка способа прогнозирования идиопатического мужского бесплодия на основе выявления наличия мутаций в гене митохондриального цитохрома B (MT-CYB) у бесплодных мужчин с астенотератозооспермией и олигоастенотератозооспермией. Технический результат при использовании изобретения - повышение точности прогноза бесплодия за счет расширения выявляемых типов патологий: олигоастенотератоспермии и астенотератозооспермии.

Предлагаемый способ прогнозирования идиопатического мужского бесплодия осуществляется следующим образом. Образцы эякулята получают путем мастурбации в стерильный одноразовый пластиковый контейнер. После сбора образцы оставляют разжижаться при температуре 37°C в течение 30 минут. Тотальную геномную ДНК, содержащую митохондриальную ДНК, выделяют из спермы пациента методом экстракции фенолом и хлороформом.

Определяют генотипы полиморфных локусов в гене MT-CYB с помощью метода дискриминации аллелей TaqMan. Для валидации мутаций в гене MT-CYB используют секвенирование ДНК методом Сэнгера на автоматическом ДНК-анализаторе (Life Technologies). При обнаружении полиморфного варианта rs527236194 (замена тимина на цитозин в позиции 15784) гена MT-CYB прогнозируют риск развития идиопатического мужского бесплодия в виде олигоастенотератоспермии или астенотератозооспермии.

Проведено исследование семенной плазмы 318 мужчин пациентов центра клиники «Семья» (г. Уфа). Диагноз идиопатического бесплодия устанавливался на основании клинических и лабораторных данных. Группа субфертильных мужчин была представлена 154 пациентами с астенотератозооспермией (N=89) и олигоастенотератоспермией (N=65), группа сравнения - фертильными мужчинами (N=164).

Для определения маркеров ДНК был использован нативный эякулят. Исследование проводили в два этапа. Первый этап - подготовительный, заключался в выделении ДНК из спермы мужчин, второй этап - в детекции нуклеотидных вариантов в локусах митохондриальной ДНК.

Методика выделения ДНК:

1. Лизис клеток - 5 мл спермы смешивали с 30-40 мл лизирующего раствора и центрифугировали при 4000 об/мин с охлаждением в течение 20 мин, при температуре +4°C. При большом количестве осадка на дне пробирки данную процедуру повторяли дважды.

2. Ферментативное разрушение белков протеиназами и/или депротеинизация клеточного лизата.

Полученный осадок переносили в отдельную пробирку, ресуспензировали его с добавлением 800 мкл Soline EDTA, 80 мкл SDS, 20-40 мкл протеиназы К, тщательно перемешивали на шейкере в течение 15 мин, после чего инкубацию полученного материала проводили в течение 12 часов при температуре 37°C.

5 3. Центрифугирование для удаления денатурированных белков и фрагментов.

После 12-часовой инкубации добавляли 800 мкл забуференного фенола и тщательно перемешивали на шейкере в течение 10 минут, затем центрифугировали при 10000 об/мин в течение 10 минут, после чего отбирали супернатант в чистую пробирку. На следующем этапе к супернатанту добавляли 500 мкл забуференного фенола и 500 мкл
10 хлороформ-изоамилового спирта, тщательно перемешивали и повторно центрифугировали при 10000 об/мин в течение 10 минут. Полученный супернатант снова отбирали в чистую пробирку, добавляли 1000 мкл хлороформ-изоамилового спирта, перемешивали, повторно центрифугировали и отбирали полученный супернатант. К супернатанту добавляли холодный 96% этиловый спирт для
15 преципитации ДНК. Затем ДНК промывали последовательно 96% и 70% этиловым спиртом, высушивали при комнатной температуре и растворяли в деионизированной воде. Концентрация и чистота выделенной ДНК оценивалась путем измерения оптической плотности с использованием спектрофотометра NanoDrop ND-1000 (Thermo Scientific). Растворенную ДНК использовали в последующем в работе для изучения
20 анализа ассоциации полиморфных вариантов rs28357373 T15629C (Leu295=); rs527236194 T15784C (p.Pro346=); rs28535()6 A15218G (p. Thr158Ala) гена MT-CYB с риском развития идиопатического бесплодия.

4. Реакцию секвенирования проводили с помощью набора флюоресцентно меченых ddNTP (Big Dye Terminators v.3.1 RR kit) по протоколу производителя. Тотальную
25 геномную ДНК, содержащую митохондриальную ДНК, выделяли из спермы методом фенольно-хлороформной экстракции.

5. Концентрация и чистота выделенной ДНК оценивалась путем измерения оптической плотности с использованием спектрофотометра NanoDrop ND-1000 (Thermo Scientific). После секвенирования выполнялось сравнение последовательностей ДНК
30 обследованных индивидов с референсной последовательностью митохондриального генома человека.

6. Определение генотипов полиморфных локусов в гене митохондриального цитохрома В осуществлялось с помощью метода дискриминации аллелей TaqMan. Анализ аллельной дискриминации проводили с использованием прибора CFX96 Real-
35 Time PCR Detection System (BioRad). Результаты каждой аллельной дискриминации были проанализированы с использованием программного обеспечения CFX96 Real-Time PCR Detection System (BioRad). В гене MT-CYB у индивидов с бесплодием не было выявлено полиморфизма локуса rs28357373 (замена тимина на цитозин в позиции 15629), следовательно, эта мутация не характерна для данной популяции и не оказывает влияние
40 на развитие мужского бесплодия. Замена аденина на гуанин в позиции 15218, приводящая к миссенс-мутации p. Thr158Ala, также не проявила себя в качестве этиологического фактора возникновения бесплодия. Достоверно значимые результаты по ассоциации с риском развития бесплодия были получены при анализе полиморфного варианта rs527236194 (замена тимина на цитозин в позиции 15784). У пациентов с олигоастенотератоспермией и астенотерато-зооспермией данная мутация встречалась значительно
45 чаще (таблица).

Частота распределения изученных вариантов мтДНК**фертильных и бесплодных мужчин**

SNP	Изменения последовательности мтДНК (изменения в белке)	Гено- - типы	Пациенты с олигоастенотератоспермией		Пациенты с астенотератозооспермией		Фертильные мужчины		P-value (OR, 95%CI)
			N	%	N	%	N	%	
rs28357373	T15629C (Leu295=)	CC	0	0	0	0	0	0	p>0,05
		CT	0	0	0	0	0	0	
		TT	65	100	89	100	164	100	
rs527236194	T15784C (p.Pro346=)	CC	6	9	12	13,5	10	6,1	p=0,04* (OR=2,4; 95%CI=0,9 9-5,8)
		CT	0	0	0	0	0	0	
		TT	59	91	77	86,5	154	93,9	
rs2853506	A15218G (p.Thr158Ala)	GG	2	3	3	3,3	4	2,4	p>0,05
		AG	0	0	0	0	0	0	
		AA	63	97	86	96,7	160	97,6	

* - сравнение фертильных и бесплодных мужчин с астенотератозооспермией. SNP - Single Nucleotide Polymorphism (однонуклеотидный полиморфизм) Leu – лейцин, Pro – пролин, Thr – треонин, Ala – аланин C – цитозин, T – тимин, G – гуанин, A – аденин

Пример 1

Пациент Д., возраст 37 лет, супруга С., возраст 28 лет, состояли в бесплодном браке в течение 5 лет, обратились в клинику ВРТ «Семья» г. Уфы по поводу бесплодия. При обследовании супруги патологических нарушений со стороны репродуктивной системы выявлено не было. При проведении обследования эякулята супруга выявлена астенотератозооспермия. Время разжижения эякулята составило 13 минут. Объем эякулята 6,2 мл. Концентрация сперматозоидов - 14,5 млн/мл, подвижных сперматозоидов 27,0%, нежизнеспособных 25,6%, атипичных форм 43,8%. У пациента проведен анализ трех полиморфных вариантов в гене митохондриального цитохрома В и выявлен полиморфный вариант rs527236194. Прогнозирован риск развития мужского бесплодия. В течение последующих двух лет беременность не наступила, что подтверждает участие анализируемого гена в развитии infertility.

Заключение: Прогноз высокого риска бесплодия, подтвердившийся в последующие после диагностики два года. Показатели спермограммы соответствуют критериям, предъявляемым экспертной группой ВОЗ к фертильной сперме, за исключением снижения показателей подвижности сперматозоидов. Результат проведенного анализа спермограммы позволяет установить причину нарушения подвижности сперматозоидов пациента и патологии фертильной функции при выявлении однонуклеотидного полиморфизма rs527236194. Женский фактор без патологии.

Пример 2

Пациент С., возраст 28 лет, в браке состоит, обратился в клинику ВРТ «Семья» г. Уфы по поводу первичного профилактического осмотра. При проведении обследования эякулята - время разжижения 15 минут. Объем эякулята - 4,8 мл, общее количество сперматозоидов 40 млн, концентрация - 15,3 млн/мл, подвижных сперматозоидов 44,9%,
 5 нежизнеспособных 26,4%, атипичных форм 38,6%. У пациента проведен анализ трех полиморфных вариантов в гене митохондриального цитохрома В rs28357373, rs527236194, rs2853506. Нарушений не выявлено. В течение года произошло зачатие у супруги с последующим нормальным течением беременности.

10 Заключение: Показатели спермограммы соответствуют критериям, предъявляемым экспертной группой ВОЗ к фертильной сперме. Отсутствие риска бесплодия. Параметры проведенного анализа спермограммы в пределах нормы. Сделан прогноз на реализацию нормальной фертильной функции.

Пример 3

15 Пациент М., возраст 34 года, супруга А., возраст 24 года, состояли в бесплодном браке в течение 3 лет, обратились в клинику ВРТ «Семья» г. Уфы. При обследовании патологических нарушений со стороны репродуктивной системы супруги выявлено не было. Время разжижения эякулята составило 10 минут. Объем эякулята 6 мл. Концентрация сперматозоидов - 10 млн/мл, подвижных сперматозоидов 30,0%,
 20 нежизнеспособных 29,5%, атипичных форм 42,9%. Была диагностирована олигоастенотератоспермия. У пациента проведен анализ трех полиморфных вариантов в гене митохондриального цитохрома В и выявлена ассоциация варианта rs527236194. Через год при повторном обращении беременность в браке не наступила, несмотря на проведенную терапию.

Заключение: Прогноз высокого риска бесплодия в виде олигоастенотератоспермии. 25 Выявленный вариант rs527236194 коррелировал с развитием олигоастенотератоспермии. Преимущества заявляемого метода:

1. Применение rs527236194-локуса в качестве биомаркера риска развития идиопатического бесплодия может быть использовано в андрологии и репродуктивной 30 медицине.

2. Предлагаемый способ прогнозирования является перспективным методом раннего выявления репродуктивной патологии с возможностью его использования для коррекции нарушений гаметогенеза и оплодотворения, ассоциированных с мтДНК, благодаря появлению и быстрому развитию технологии редактирования митохондриального генома.

(57) Формула изобретения

Способ прогнозирования идиопатического мужского бесплодия, включающий генотипирование, отличающийся тем, что проводят сбор эякулята, полученного путем мастурбации, инкубацию в термостате при 37°C, после чего выделяют
 40 митохондриальную ДНК, определяют генотипы полиморфных локусов в гене митохондриального цитохрома В (МТ-СУВ) с помощью метода дискриминации аллелей TaqMan и при обнаружении генотипа СС полиморфного варианта rs527236194 гена МТ-СУВ прогнозируют риск развития идиопатического мужского бесплодия в виде олигоастенотератоспермии или астенотератозооспермии.