Санкт-Петербургский государственный университет

кафедра Генетики и биотехнологий

**Беспалов Николай Алексеевич**

**Выпускная квалификационная работа**

**Оценка профиля метилирования ДНК при криоконсервации и длительном хранении половых клеток человека**

Уровень образования:

Направление 06.03.01 «Биология»

Основная образовательная программа бакалавриата СВ.5017.2020 «Биология»

Работа выполнена в

ФГБНУ “НАУЧНО-ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ ИНСТИТУТ АКУШЕРСТВА, ГИНЕКОЛОГИИ И РЕПРОДУКТОЛОГИИ ИМЕНИ Д.О. ОТТА”, отдел геномной медицины имени В.С. Баранова;

отдел репродуктологии, лаборатория раннего эмбриогенеза

Научный руководитель:

Заведующий отдела геномной медицины ФГБНУ НИИ им. Отта,

д.б.н. Глотов Андрей Сергеевич

Научный консультант:

Заведующая лаборатории раннего эмбриогенеза,

к.б.н. Комарова Евгения Михайловна

Санкт-Петербург

2024

Оглавление

[Список сокращений 3](#__RefHeading___1)

[1. Введение 4](#__RefHeading___2)

[2.Обзор литературы 6](#__RefHeading___3)

[3. Материалы и методы 14](#__RefHeading___4)

[4. Результаты и их обсуждение 24](#__RefHeading___5)

[5. Выводы 33](#__RefHeading___6)

[6. Благодарность 34](#__RefHeading___7)

[7. Список литературы 35](#__RefHeading___8)

# Список сокращений

АФК - активные формы кислорода

БПК - буфер для протеинкиназы К

ВРТ - вспомогательная репродуктивная технология

ВОЗ - всемирная ассоциация здравоохранения

ДНК - дезоксирибонуклеиновая кислота

DMR - дифференциально метилированная область

DMSO - диметилсульфоксид

DIN (DNA Integrity Number)- показатель целостности ДНК

MAR тест - определение антиспермальных антител классов IgA, IgG

ИКСИ - введение сперматозоида в цитоплазму

IgF- инсулиноподобный фактор роста

IM - неподвижные сперматозоиды

NP - непрогрессивно-подвижные сперматозоиды

ПВП - поливинилпирролидон

ПЭГ- полиэтиленгликоль

ПЦР - полимеразная цепная реакция

PR - прогрессивно-подвижные сперматозоиды

РНК - рибонуклеиновая кислота

SDS - натрий додецилсульфат

ЭКО - экстракорпоральное оплодотворение

ЭДТА - этилендиаминтетрауксусная кислота

# 1. Введение

Бесплодие — актуальная проблема современной биологии и медицины. Бесплодным считается брак, в котором отсутствует беременность в течение года регулярной половой жизни без применения контрацепции. По данным Всемирной организации здравоохранения частота бесплодия во многих странах, в том числе и в России, достигает 17% [1]. Причиной отсутствия беременности в 40% случаев является женский фактор, в 60% мужской фактор, и в 30-48% выделяют сочетанное бесплодие [2]. Вспомогательные репродуктивные технологии представляют собой методы лечения бесплодия, при применении которых отдельные или все этапы зачатия и раннего развития эмбрионов осуществляются вне материнского организма, в том числе с использованием донорских и/или криоконсервированных половых клеток и эмбрионов. Согласно отчету Российской ассоциации репродукции человека за 2021 год в России было проведено 149 000 циклов ЭКО, из них более 13,5% циклов с использованием криоконсервированного биоматериала [3].

Практика применения материала, подверженного криоконсервации, используется повсеместно, что приводит к созданию криобанков спермы, сохраняющие лучшие образцы. Криоконсервация биоматериала проводится с использованием специальных сред, в составе которых используются высокорастворимые малотоксичные вещества - криопротекторы. Криопротекторы способствуют сохранению клеток при медленной заморозке, защищая клетки от осмотического шока, нарушения целостности клеточной стенки и препятствуют кристаллизации молекул H2O внутри клетки. Однако влияние криопротекторов при криоконсервации и самого механизма медленной заморозки на эпигеном сперматозоидов не до конца изучены. Ранее изучалось влияние криоконсервации в промоторных областях импринтированных генов *SNURF-SNRPN* и *UBE3A*, *PWS-ICR* и *AS-ICR* в области хромосомы 15q11-q13. Воздействие криопротектора не оказывало существенного влияния на уровни АФК (активный формы кислорода) и фрагментацию ДНК сперматозоидов. Ни криоконсервация, ни воздействие криопротектора существенно не влияли на метилирование ДНК выбранных участков гена. Однако фрагментация ДНК спермотозоидов имела положительную корреляцию с метилированием ДНК *AS-ICR* [4]. На сегодняшний день проблема метилирования в мужских половых клетках изучена не в полном объеме.

Целью работы является оценка изменения профиля метилирования ДНК сперматозоидов человека после криоконсервации.

Для достижения поставленной цели были поставлены следующие задачи:

1. Освоить методы характеризации, криоконсервации и разморозки эякулята, метод бисульфитного секвенирования;
2. Создать и охарактеризовать коллекцию образцов эякулята с тератозооспермией;
3. Оценить качество ДНК сперматозоидов после криоконсервации;
4. Подобрать оптимальные условия для проведения амплификации дифференциально метилированной области гена *Н19.* Провести оценку метилирования исследуемых образцов и сравнить профили метилирования ДНК исследуемых образцов после криоконсервации.

# 2.Обзор литературы

**2.1. Бесплодие как актуальная проблема современной медицины**

Бесплодие — актуальная проблема современной биологии и медицины. Бесплодным считается брак, в котором отсутствует беременность в течение года регулярной половой жизни без применения контрацепции [5].

Бесплодие может быть женское, мужское и смешанное. Частота женского бесплодия по данным метаанализа 2022 г. (32 исследования с низким риском систематической ошибки с участием 124 556 женщин) составила 46,3%, при этом доля первичного бесплодия оказалась выше (51,5%) по сравнению со вторичным (48,5%) [6]. Распространенность женского бесплодия в Российской Федерации за период с 2011 по 2021 г. выросла на треть и в 2021 г. в целом по стране составила 789,1 случаев на 100 тыс. женщин (данные Минздрава России, заболеваемость по данным обращаемости, отчетная форма ФСН №12), при этом потери потенциальных рождений за счет бесплодия (как у женщин, так и у мужчин) суммарно составляют 17—21% [7]. В ряде публикаций указывается, что частота бесплодия в семейных парах колеблется от 17,2 до 24% в различных регионах Российской Федерации [7]. Частота мужского бесплодия за последние десятилетия выросла в 3 раза и равна 28,5% [8]. В каждой третьей паре с бесплодием у обоих партнеров есть нарушения в репродуктивной системе.

Исследования показывают, что на мужские факторы приходится примерно 20-30% случаев бесплодия [9].

Одним из способов лечения бесплодия является применения вспомогательных репродуктивных технологий, при применении которых отдельные или все этапы зачатия и раннего развития эмбрионов осуществляются вне материнского организма (в том числе с использованием донорских и (или) криоконсервированных половых клеток, тканей репродуктивных органов и эмбрионов, а также суррогатного материнства) [1].

К вспомогательным репродуктивным технологиям относятся программы и методы, в которых производятся манипуляции вне организма либо с яйцеклетками и сперматозоидами, либо с эмбрионами в целях репродукции такие как:

* экстракорпоральное оплодотворение (ЭКО);
* криоконсервация гамет, эмбрионов;
* донорство спермы;
* инъекция сперматозоида в цитоплазму ооцита;
* рассечение оболочки эмбриона (вспомогательный хетчинг);
* донорство ооцитов;
* донорство эмбрионов;
* суррогатное материнство;
* преимплантационное генетическое тестирование;
* операции по получению сперматозоидов дляИКСИ.

В качестве медицинской услуги, за первым вариантом ВРТ закрепилось название экстракорпоральное оплодотворение (ЭКО), за вторым инъекция сперматозоида в цитоплазму яйцеклетки (ИКСИ) [1].

**2.2. Оценка качества эякулята в программах ВРТ**

С целью выявления/диагностики состояний, которые могут снижать шансы на положительный результат рождения здорового ребенка или быть причиной осложнений в результате проводимых инвазивных вмешательств, перед проведением ЭКО должно быть проведено следующие обследование [10]:

Женщине:

* клинический анализ крови;
* анализ крови биохимический общетерапевтический;
* коагулограмма (ориентировочное исследование системы гемостаза);
* общий анализ мочи;
* определение иммуноглобулинов класса М и G к Rubella в крови.

Мужчине:

* исследование эякулята.

Для оценки мужского репродуктивного здоровья проводят полный спермиологический анализ. Сперма извергается порционно во время эякуляции и состоит из производимых яичками сперматозоидов и семенной жидкости, которая секретируется простатой, семенными пузырьками и бульбоуретральными железами. Сперму собирают в чистый нетоксичный для сперматозоидов пластиковый или стеклянный контейнер путем мастурбации в специальном помещении вблизи лаборатории. До исследования контейнер следует хранить при температуре от 20 до 37 °C. Перед исследованием необходимо половое воздержание от 2 до 7 дней.. При невозможности сбора спермы путем мастурбации ее можно собрать в ходе полового акта в специальный презерватив, который не содержит токсичный для сперматозоидов латекс [11]. Международный стандарт оценки результатов спермиологического анализа (спермограммы) — критерии ВОЗ от 2010 г. (таблица 1) [12]:

Таблица 1. Минимальные значения показателей эякулята согласно руководству ВОЗ 2010 г.

|  |  |
| --- | --- |
| Показатель | Минимальное значение |
| Объем эякулята, мл | 1,5 |
| Общее количество спрматозоидов вэякуляте, ^6 на образец | 39 |
| Концентрация сперматозоидов, 10^6 на мл | 15 |
| Общая подвижность (PR+NP), % | 40 |
| Прогрессивно-подвижные (PR), % | 32 |
| Жизнеспособность (живые сперматозоиды), % | 58 |
| Морфология сперматозоидов (нормальные формы), % | 4 |
| pH | ≥7 |
| MAR-тест, % | <50 |

Для параметров спермы характерна высокая вариабельность, именно поэтому при обнаружении отклонений в спермограмме необходимо повторное выполнение анализа. Для описания отклонений параметров спермы от референтных значений руководство ВОЗ предлагает использовать следующую номенклатуру (таблица 2) [12].

Таблица 2. Термины, используемые для описания результатов спермограммы.

|  |  |
| --- | --- |
| Название | Описание |
| Нормозооспермия | Общее число (или концентрация) сперматозоидов, доля прогрессивно подвижных и морфологически нормальных сперматозоидов равна или выше референтных значений |
| Олигозооспермия | Уменьшение общего числа или концентрации сперматозоидов |
| Тератозооспермия | Уменьшение доли морфологически нормальных сперматозоидов |
| Астенозооспермия | Уменьшение доли прогрессивно-подвижных сперматозоидов |
| Астенотератозооспермия | Уменьшение доли прогрессивно-подвижных и морфологически нормальных сперматозоидов |
| Олиготератозооспермия | Уменьшение общего количества или концентрации, а также морфологически нормальных сперматозоидов |
| Олигоастенотератозооспермия | Уменьшение общего количества или концентрации сперматозоидов, а также их морфологически нормальных и прогрессивно-подвижных форм |
| Некроспермия | Уменьшение доли живых и увеличение доли неподвижных сперматозоидов |
| Азооспермия | Отсутствие сперматозоидов |
| Аспермия | Отсутствие эякулята или ретроградная эякуляция |

Самой тяжелой с клинической точки зрения является азооспермия. Азооспермия характеризуется отсутствием сперматозоидов в эякуляте. Азооспермией страдают ~10% мужчин, страдающих бесплодием [13].

**2.3. Криоконсервация эякулята**

Часто в практике ЭКО требуется сохранение спермы в течение нескольких дней или недель. Для этого образец подвергается процессу заморозки, для сохранения изначальных свойств и применения в дальнейшем.

На сегодняшний день в клинической практике используют две стратегии замораживания:

1. медленная заморозка;
2. витрификация [14].

Постепенное снижение температуры во время медленной заморозки позволяет клеткам пройти дегидратацию и замещение воды криопротекторами, что обеспечивает минимальное формирование кристаллов льда вокруг и внутри клетки. Для проведения этой процедуры используется оборудование, которое обеспечивает точные и постоянные параметры охлаждения - программируемый замораживатель [15].

Криоконсервация - процесс сохранения живых биологических объектов при ультранизких температурах, с возможностью восстановления их биологических функций после размораживания [16]. Для проведения криоконсервации, используют специальные высокорастворимые вещества - криопротекторы, способные предотвращать развитие терминальных криоповреждений (преодоление осмотического шока) и сохранять целостность клеток, за счет изменения характера кристаллизации как внутри так и снаружи клетки [17]. Стоит заметить, что криопротекторы обладают низкой цитотоксичностью и понижают точку замерзания/плавления растворов.

Криопротекторы бывают двух типов: проникающие сквозь плазматическую мембрану и непроникающие [18].

Проникающие криопротекторы характеризуются небольшой молекулярной массой (менее 100 Да), к ним относится Глицерин (1,2,3-пропантриол), этиленгликоль (1,2-этандиол), диметилсульфоксид (DMSO), пропиленгликоль (1,2-пропандиол).

Не проникающие сквозь плазматическую мембрану криопротекторы обладают более высокой молекулярной массой и повышают осмолярность, создавая градиент для дегидратации клеток и замещения внутриклеточной воды проникающими криопротекторами. Выделяют следующие не проникающие через мембрану криопротекторы: полиэтиленгликоль (ПЭГ), поливинилпирролидон (ПВП), сахароза, декстроза,лактоза, раффиноза [19].

Как правило, для максимального эффекта, при работе с образцами эякулата выбирают среды, в составе которых входит комбинация из проникающего и не проникающих криопротекторов.

Помимо криопротекторов в состав сред входят и другие компоненты, такие как: липофильные вещества, изменяющие фазовое состояние липидов плазматической мембраны (раствор альбумина человека, лектин) делающие плазматическую мембрану более “жидкой”, а также хелаты, связывающие внеклеточный кальций (EDTA, цитрат), вещества, предотвращающие пероксидацию липидов (глутатион), и буфер, позволяющий поддерживать стабильный pH (HEPES).

Чаще всего выбор клиник, работающих с технологией криоконсервации, останавливается на средах, основой которых являются проникающие криопротекторы (глицерин, метанол, сывороточный альбумин) и непроникающий криопротектор - пропиленгликоль (PROH) из-за оптимального соотношения цена/качество.

Стандартная методика криоконсервации сперматозоидов заключается в следующих этапах:

1. Образцы яэкулята оставляют при комнатной температуре на 30 минут для разжижения
2. Смешивают в определенных пропорциях среду с криопротектором с образцами эякулята.
3. Проводят уравновешивание образцов в течении 10 минут.
4. Помещают уравновешенные образцы в жидкоазотную баню в пары азота для первичной заморозки на 15 минут.
5. Перенос образцов в криохранилища в специальные резервуары на температуру -196 °С для длительного хранения.

В современной криобиологии влияние заморозки изучено недостаточно, в частности, нет единого мнения о влиянии криопротекторов и процесса криоконсервации на эпигеном половых клеток, а именно метилирование ДНК.

**2.4. Метилирование ДНК как эпигенетический фактор мужского бесплодия**

ДНК метилирование - это модификация молекулы ДНК без изменения самой нуклеотидной последовательности. Заключается в присоединении метильной группы к цитозину в составе CpG-динуклеотида в позиции С5 цитозинового кольца. Метилирование в промоторной зоне гена, зачастую, приводит к подавлению соответствующего гена [20]. При исследовании метилирования изучают импринтинговые гены, гены, которые моноаллельно экспрессируются зависимым от родительского происхождения образом. Каждый импринтированный локус имеет по крайней мере одну дифференциально метилированную область (DMR), которая имеет аллель-специфическое метилирование ДНК и способствует экспрессии импринтированного гена. Помимо того, что DMR метилированных только по материнской или отцовской линии, они имеют различия в том, было ли метилирование приобретено в зародышевой линии или после оплодотворения, так и присутствуют в различных участках генома с разной плотностью CpG-островков - последовательностью около 200 п.н., располагающейся в промоторной зоне гена, богатой CpG динуклеотидами, которые являются маркерами метилирования, из-за особенности присоединении метильной группы к цитозину в позиции С5 цитозинового кольца при помощи метилтрансферазы с образованием 5-метилцитозина.

У человека анализ некоторых генов, импринтированных родителями, показал, что криоконсервация сперматозоидов не влияет на импринтированные матерью гены *LIT1, SNRPN, MEST и SNURF-SNRPN*, импринтированные отцом гены *MEG3, H19 и UBE3A*, а также на специфический для сперматогенеза ген (*VASA*) и на ген (*MTHFR*), некоторые полиморфизмы которого ассоциированы с мужским бесплодием. Однако, исследование третьего гена-кандидата показало, что криоконсервация сперматозоидов вызывает повышенное метилирование в промоторных областях трех других “отцовских” генов (*PAX8, PEG3 и RTL1*) [21]. В другом исследовании проводили изучение профилей метилирования двух “отцовских” (*H19* и *GTL2*) и 5 “материнских” метилированных (*LIT1, MEST, NESPAS, PEG3* и *SNRPN)* импринтированных генов, а также повторяющихся элементов ALU и LINE1 в 141 образце спермы, при этом у 106 пар со строго мужским фактором или комбинированным мужским и женским бесплодием и у 28 пар со строго женским фактором бесплодия. Половина образцов подвергалась криоконсервации. Полученные результаты указывали на незначительное изменение профиля метилирования в гене *H19* в образцах, подвергнутых криоконсервирвированию [22].

**2. 5. Ген *H19* - маркер метилирования ДНК**

Объектом нашего исследования стал импринтинговый ген  *H19* сперматозоида человека. Ген *H19* располагается на хромосоме 11 в локусе 11p15.5. Он экспрессируется исключительно с аллели, принадлежащей материнской хромосоме 11. Ген *H19* кодирует белок размером 29k, а также цитоплазматическую РНК нетранслируемого типа, участвующую в транспорте/синтезе и процессинге РНК [23]. Он также участвует в регуляции различных клеточных и биологических процессов, включая эмбриональное развитие, рост клеток и дифференцировку.

Продукт гена *H19* участвует в развитии и прогрессировании рака, поскольку было обнаружено, что он нарушается при различных видах рака, включая рак молочной железы, печени, легких и мочевого пузыря. Важно отметить, что продукт гена *H19* действует как онкоген и супрессор опухолей, что указывает на то, что его роль в развитии рака многогранна и варьируется в зависимости от типа рака и конкретного клеточного контекста. В дополнение к своим биологическим функциям, *H19* является ключевым биомаркером, потенциально закладывая основу для внедрения методов лечения рака, а также других возраст-зависимых заболеваний. За последние 15 лет изучения гена *Н19* было выяснено, что ген кодирует 2,3-килобайтную некодирующую мРНК, которая сильно экспрессируется во время эмбриогенеза. Также ген *H19* был описан как предполагаемый ген-супрессор опухолей. *H19* влияет на рост посредством цис-контроля экспрессии Igf2. Хотя мыши *H19* –/– жизнеспособны, роль этого гена в процессе развития была предложена жизнеспособными мышами с партеногенетическим геномом *H19* –/–. Также накопленные данные свидетельствуют о том, что длинная некодирующая РНК H19 коррелирует с несколькими процессами старения. Однако роль *H19* в старении остается неясной. Многие исследования выявили тесную связь между *H19* и воспалительными генами. Хроническое системное воспаление является установленным фактором, связанным с различными заболеваниями в период старения. Таким образом, *H19* может участвовать в развитии возрастных заболеваний, взаимодействуя с воспалением, и, таким образом, обеспечивать защитную функцию против возраст-зависимых заболеваний.

# 3. Материалы и методы

**3.1. Вспомогательные репродуктивные технологии**

**3.1.1 Сбор образцов**

В качестве материала были использованы образцы эякулята пациентов, обратившихся в отделение ВРТ ФГБНУ “НИИ АГиР им. Д. О. Отта” в связи с бесплодием в паре. Все пациенты предоставили письменное информированное согласие на участие в исследовании.

Биоматериал был собран пациентом путем мастурбации в стерильный пластиковый контейнер в отделении ВРТ ФГБНУ “НИИ АГиР им. Д. О. Отта”, после сбора биоматериал в течение 2 часов передавался на стандартный спермиологический анализ.

**3.1.2 Стандартный спермиологический анализ**

Семиологический анализ начинали с простого осмотра эякулята после разжижения, желательно через 30 мин, но не более чем через 1 ч после семяизвержения для того, чтобы предотвратить дегидратацию или изменения температуры, которые могут влиять на качество эякулята.

Стандартный спермиологический анализ, или спермограмма, проводился согласно рекомендациям ВОЗ 2010 года [17].

Первоначальная макроскопическая оценка эякулята:

Макроскопическая оценка эякулята включает в себя оценку таких параметров как:

1. **Объем образца**, с использованием центрифужной пробирки. Объем эякулята составляет по большей части секрет семенных пузырьков и простаты с небольшим количеством секрета луковично-уретральных желез и эпидидимиса. Точное измерение объема позволяет рассчитать общее количество сперматозоидов и не сперматогенных клеток в эякуляте [24].
2. **Разжижение**. В течение нескольких минут при комнатной температуре семенная жидкость начинает разжижаться (становится водянистой), и со временем превращается в гетерогенную смесь с взвесями. По мере разжижения эякулят становится гомогенным и довольно водянистым, а в финальной стадии остаются только небольшие области коагуляции. Весь образец обычно разжижается в течение 15 мин при комнатной температуре, хотя редко разжижение может занимать до 60 мин и более. Если полного разжижения не произошло за 60 мин, это следует записать.
3. **Вязкость**. После разжижения вязкость образца можно оценить с помощью аккуратной аспирации эякулята в одноразовую пластиковую пипетку с широким горлом (приблизительно 1,5 мм в диаметре), позволяя ему капать и наблюдая длину формирующейся нити. В норме эякулят выходит из пипетки небольшими дискретными каплями. Если вязкость аномальная, капля будет формировать нить более 2 см в длину.
4. **Цвет образца**. В норме разжиженный семиологический образец должен быть гомогенным, сероватого цвета, слегка опалесцирующим.
5. **pH образца**. рН спермы отражает баланс между значениями рН секретов желез дополнительной секреции, в основном щелочным секретом семенных пузырьков и кислотным секретом предстательной железы. рН следует измерять после разжижения в одно и то же время, предпочтительно после 30 мин, но в любом случае в течение 1 ч после семяизвержения, так как рН изменяется при снижении уровня СО2, которое происходит после эякуляции. В норме следует использовать рН-бумагу с диапазоном значений между 6,0 и 10,0.

Следующим этапом проводили микроскопическую оценку эякулята:

1. **Приготовление влажного препарата**. Разжиженную аликвоту (10 мкл) образца эякулята помещали в камеру Маклера для дальнейшего изучения в световом микроскопе.
2. **Оценка агрегации сперматозоидов**. Слипание либо неподвижных сперматозоидов друг с другом, либо подвижных сперматозоидов с нитями слизи, не сперматогенными клетками или дебрисом.
3. **Оценка агглютинации сперматозоидов**. Агглютинация относится только к подвижным сперматозоидам, которые приклеиваются друг к другу, головка к головке, жгутик к жгутику или смешанным образом. Преобладающий тип агглютинации (выраженный по степеням (степени 1–4) и область склеивания сперматозоидов (степень А–Е) должны быть записаны:

• Степень 1: изолированные менее 10 сперматозоидов на агглютинат, большинство сперматозоидов свободны

• Степень 2: средняя степень 10–50 сперматозоидов на агглютинат, свободные сперматозоиды

• Степень 3: значительная степень в агглютинатах более 50 сперматозоидов, некоторые клетки остаются свободными

• Степень 4: тяжелая степень все сперматозоиды агглютинируют, агглютинаты взаимосвязаны.

1. **Оценка подвижности сперматозоидов**. Подвижность сперматозоидов оценивали с использованием следующей классификацией:

* Прогрессивно-подвижные (PR, progressive motility): сперматозоиды, двигающиеся активно, либо линейно, либо по кругу большого радиуса, независимо от скорости.
* Непрогрессивно-подвижные (NP, non-progressive motility): все другие виды движений с отсутствием прогрессии, то есть плавающие по кругу небольшого радиуса, жгутик с трудом смещает головку или когда наблюдают только биение жгутика.
* Неподвижные (IM, immotility): отсутствие движения.

1. **Концентрация сперматозоидов**. Подсчет концентрации сперматозоидов проводили в 10 квадратах камеры Маклера, учитывали только сперматозоиды с головкой и хвостом [12].

На заключительном этапе спермограммы проводили оценку морфологии сперматозоидов. Для этого готовили препараты из эякулята: образцы нативного эякулята дважды отмывали с использованием физиологического раствора, супернатант удаляли, осадок ресуспендировали и наносили 100 мкл суспензии на предметное стекло, каплю растягивали покровным стеклом, высушивали на воздухе, затем фиксировали этиловым спиртом 70°С и окрашивали гематоксилином - эозином.

**3.1.3 Криоконсервация образцов**

Для проведения криоконсервации эякулята использовали коммерческую среду для криоконсервации SpermFreeze (FertiPro N.V., Бельгия) согласно рекомендациям фирмы-производителя:

1. Оставляли сперму при комнатной температуре на 30 минут для разжижения.
2. Смешивали 1 мл спермы с 0,7 мл среды SpermFreeze (FertiPro N.V., Бельгия), добавляя среду капельно, аккуратно перемешивая. Оставляли образцы эквилибрироваться при комнатной температуре на 10 минут.
3. Переливали образец в промаркированные криовиалы.
4. Помещали криовиалы в пары жидкого азота в жидкоазотную баню на 30 минут.
5. После переносили криовиалы в жидкий азот для длительного хранения на температуру -196°С.

**3.1.4 Создание коллекции образцов, хранение и размораживания биоматериала**

Коллекцию образцов от пациентов с тератозооспермией создавали согласно стандартным операционным процедурам, криоконсервацию биоматериала проводили согласно п. 2.1.3. От каждого пациента получали две аликвоты образцов криоконсервированного эякулята. Критериями включения доноров в коллекцию являлись: возраст от 18 лет, наличие подтвержденной тератозооспермии согласно стандартному спермиологическому анализу. Критерием исключения являлось наличие инфекционных заболеваний (ВИЧ, сифилис, гепатиты).

Промаркированные криовиалы помещали на хранение в криобанк отдела ВРТ ФГБНУ “НИИ АГиР им. Д. О. Отта”, вносили информацию в информационную систему (базу данных).

Долгосрочное хранение образцов проводили в жидком азоте при -196°С в сосудах Дьюара, как минимум в течение 3 месяцев.

Процесс размораживания проводили по следующей методике:

1. Криовиалы размораживали под струей холодной проточной воды в течении 7 минут.
2. Образец центрифугировали в течение 10 минут при 300g в среде для приготовления спермы SeprmRinse (Vitrolife, Швеция).
3. Удаляли супернатант, осадок ресуспендировали в среде для приготовления спермы SeprmRinse (Vitrolife, Швеция) в конечном объеме 1 мл.

**3.2. Исследование метилирования образцов ДНК**

**3.2.1 Выделение ДНК из первичного и криоконсервированного эякулята**

Выделение ДНК из полученных образцов сперматозоидов проводили по следующей методике:

1. Перенести 1 мл образцов в 2 мл пробирки, для последующего центрифугирования на максимальной скорости (13,4 тыс. оборотах в минуту) в течение 10 минут.
2. Слить полученную надосадочную жидкость, добавив к полученному осадку 400 мкл БПК, 20 мкл SDS, 15 мкл Протеинкиназы K. Полученную смесь провортексировать в течении 30 секунд.
3. Поместить образцы в термостат на температуру 36,4°С на 5 часов.
4. По прошествии времени добавить в образцы 500 мкл 5М NaCI и поместить в вортекс на 10 минут.
5. Добавить 500 мкл хлороформа и заново поместить в вортекс на 10 минут.
6. Центрифугировать полученные образцы 10 минут на скорости 13400 оборотах в минуту.
7. Полученную надосадочную жидкость переместить в новую пробирку с последующим добавлением 1 мл 96% этанола.
8. Поместить в вортекс на 10 минут.
9. Центрифугировать при максимальной скорости в течении 5 минут.
10. Слить надосадочную жидкость, добавив к осадку 1 мл 70% этанола.
11. Поместить в вортекс на 10 минут.
12. Центрифугировать на максимальной скорости в течение 10 минут.
13. Слить надосадочную жидкость и поместить образцы в термостат для дальнейшей сушки при 36,4 °С на 4 часа.
14. Полученные образцы развести в 150 мкл H2O.

**3.2.2 Оценка качества выделенной ДНК**

Оценку качества выделенной ДНК проводили путем флуориметрического измерения концентрации на флуориметре Qubit 2.0 (Invitrogen, США) набором dsDNA HS Assay Kit, чистоту раствора ДНК определяли спектрофотометрически на приборе Nanodrop 2000 (Thermo Scientific, США). Число целостности ДНК (DIN - DNA Integrity Number) определяли на системе капиллярного гель-электрофореза 2200 TapeStation Instrument (Agilent Technologies, США) набором Genomic DNA ScreenTape.

3**.2.3.** **Бисульфитная конверсия образцов ДНК**

Бисульфитную конверсию полученных образцов ДНК проводили с помощью набора EZ DNA Methylation-Gold Kit (Zimo Research, США) согласно протоколу производителя:

1. К 130 мкл СТ реагента добавляли 20 мкл ДНК. Разницу в объеме компенсировать H2O. Оптимальное количество введенной ДНК составляло 200-500 нг.
2. Образец помещали в термоциклер при следующих условиях:

1. 98°С на 10 минут

2. 64°С на 2,5 часа

3. 4°С до 20 часов (хранение)

1. Добавляли 600 мкл M- Binding Buffer в колонку Zimo-Spin, добавили 150 мкл образца и поместили на 30 секунд в центрифугу на 10000 оборотов в минуту.
2. Слили процентрифугированную жидкость и добавили 100 мкл M-Wash Buffer.
3. Процентрифугировали при тех же условиях, слили центрифугированную жидкость и добавили 200 мкл M-Desulphonation Buffer и оставили при комнатной температуре на 20 минут. По прошествии времени процентрифугировали при тех же условиях.
4. Слили жидкость из колонки, добавили 100 мкл M-Wash Buffer, процентрифугировали при тех же условиях, слили из колонки жидкость и заново добавили M-Wash Buffer для последующего центрифугирования. Слили жидкость из колонки.
5. Перенесли колонку в 1,5 мл пробирку, добавляли 50 мкл M-Elution Buffer, центрифугировали на максимальной скорости 30 секунд. Полученную ДНК в пробирке поместили в холодильник на 4°С для последующего хранения.

**3.2.4. Подбор праймеров и ПЦР**

Подбор праймеров осуществляли с помощью программного обеспечения MethPrimer (www.urogene.org/methprimer/index1.html) [25]. *H19*-специфичные праймеры для модифицированной ДНК (таблица 3), использованные для реакции, были синтезированы на основе последовательности импринтированного гена *H19*, которые содержали 18 CpG-локусов (Beagle, Россия).

Таблица 3. Праймеры к фрагменту гена *H19,* богатому CpG-сайтами.

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| Праймеры  № (Tm, °С) | прямой | обратный |
| 1 (60°С) | 5’-TATGGGTATTTTTGGAGGTTTTTT-3’ | 5’-ACTCCCATAAATATCCTATTCCCA-3’ |
| 2 (55°С) | 5’-TATGGGTATTTTTGGAGGTTTTTT-3’ | 5’-TCCCATAAATATCCTATTCCCAAA-3’ |
| 3 (60°С) | 5’-TAGGGTTTTTGGTAGGTATAGAGTT-3’ | 5’-CCATAAATATCCTATTCCCAAA-3’ |
| 4 (60°С) | 5’-AGGGTTTTTGGTAGGTATAGAGTT-3’ | 5’-CCCATAAATATCCTATTCCCAAATAA-3’ |
| 5 (55°С) | 5’-GTAGGGTTTTTGGTAGGTATAGAGTT-3’ | 5’-CCCATAAATATCCTATTCCCAAATAA-3’ |

Амплификацию фрагментов ДНК проводили на программируемом термоциклере «Veriti» (Applied Biosystems, США).

Реакционная смесь (общий объем 50 мкл) 3 мкл 0,025 М MgCl2, 1 мкл dNTP (Сибэнзим, Россия), 5 мкл буфера для Hot-Start Taq ДНК-полимеразы (Сибэнзим, Россия), 4 мкл смеси праймеров (Beagle, Россия), 32 мкл воды, 1 мкл Hot-Start Taq ДНК-полимеразы (Сибэнзим, Россия).

ДНК, после бисульфитной конверсии, добавляли по 2 мкл к 48 мкл реакционной смеси. Каждый образец делали в двух повторностях. В качестве отрицательного контроля ПЦР использовали деионизированную воду.

Амплификацию проводили в следующем режиме:

1. Начальная денатурация: 95 ºС – 3 мин;
2. Основной цикл (50 циклов):

Денатурация: 94 ºС – 30 с;

Отжиг праймеров: 55 - 62 ºС – 30 с;

Синтез: 72 ºС – 1 мин;

1. Завершающий синтез: 72 ºС – 20 мин.

**3.2.5. Электрофорез продуктов амплификации**

Продукты амплификации разделяли в электрофорезе в полиакриламидном геле, применяя следующую методику:

1. Добавляли в пробирку 10 мл 30% АА, 5 мл ТВЕ, довели полученную смесь до 40 мл с помощью дистиллированной воды.
2. В полученную смесь добавляли 500 мкл PSA, 40 мкл TEMED, тщательно перемешав в течении 20 секунд.
3. Залили полученную смесь в заранее подготовленную форму для проведения электрофореза.
4. Вставили нужную гребенку для создания лунок, для образцов и плотно прижали тяжелым предметом на 10 минут.
5. Полученный гель вставили в камеру для электрофореза, и залили 1х ТБЭ.
6. 10 мкл полученной ПЦР-смеси добавляли 0,5 мкл красителя для электрофореза (50 % глицерина, 50 % 1х буфера ТБЭ, бромфеноловый синий), перемешивали пипетированием и вносили в лунку полиакриламидного геля.

Электрофорез проводили при 350 В, пока маркер не пройдет весь гель. Длительность электрофореза составляла 90 минут.

Результаты электрофоретического разделения фрагментов ДНК анализировали с помощью трансиллюминатора Macrovue (LKB, Великобритания).

**3.2.6. Секвенирование по методу Сэнгера**

*Подготовка переосаждающей жидкости*

400 мкл 5 М ацетата аммония и 840 мкл очищенной от нуклеаз воды смешивали в центрифужной пробирке типа фалькон и доводили 100 % этанолом объем до 10 мл, перемешали.

*Очистка продукта ПЦР-реакции*

1. 30 мкл продукта ПЦР реакции перенесли из микропробирки в пробирку типа эппендорф объемом 1,5 мл.
2. К продукту добавляли 150 мкл переосаждающей жидкости, перемешали методом пипетирования, инкубируют при комнатной температуре в течение 15 минут.
3. Пробирки центрифугировали при 13400 об/мин в течение 30 минут при комнатной температуре.
4. Слили надосадочную жидкость, добавили 1 мл 70 % этанола на стенку пробирки, инкубировали в течение 10 секунд.
5. Слили спирт, в пробирке с открытой крышкой высушили осадок в термостате при 55 °С в течение 15 минут или до испарения спирта.
6. Осадок ресуспендировали в 10 мкл безнуклеазной воды.
7. Проверили наличие искомого фрагмента методом электрофореза 1 мкл очищенного продукта ПЦР в 7,5 % полиакриламидном геле. При отсутствии искомого фрагмента требуется повторная постановка ПЦР. При наличии искомого фрагмента переходят к постановке реакции терминаторов, предварительно запрограммировав амплификатор.

*Программирование амплификатора*

На амплификаторе была создана программа под названием «Sequencing» со следующими условиями реакции (таблица 1):

Таблица 4 – Условия прохождения реакции терминаторов

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| Температура | Длительность | Количество циклов |
| 96°С | 1 минута | 1 цикл |
| 96°С | 10 секунд | 25 циклов |
| 50°С | 5 секунд |
| 60°С | 4 минуты |
| 10°С | 7 минут | хранение |

Объем реакционной смеси составляет 9,5 мкл.

*Реакция терминаторов*

1. С целью проведения реакции были промаркированы 2 микропробирки объемом 0,2 мл.
2. В каждую из микропробирок добавляли 3 мкл 5X Sequencing Buffer, 0,75 мкл BigDye Terminator v3.1 Ready Reaction Mix, 4,25 мкл безнуклеазной воды, 1 мкл продукта амплификации после этапа очистки.
3. В одну из пробирок добавляли 0,5 мкл праймера forward, во вторую пробирку добавляли 0,5 мкл праймера reverse.
4. Содержимое обеих пробирок перемешивали на центрифуге-вортексе в течение 3 секунд и центрифугировали на центрифуге-вортексе в течение 3 секунд.
5. Микропробирки с реакционной смесью помещали в предварительно запрограммированный амплификатор и запускали программу «Sequencing».

*Очистка продукта реакции терминаторов*

1. Весь объем (9,5 мкл) продукта реакции терминаторов переносили из микропробирки в пробирку типа эппендорф объемом 1,5 мл.
2. К продукту добавляли 70 мкл переосаждающей жидкости, перемешивали методом пипетирования, инкубирули при комнатной температуре в течение 15 минут.
3. Пробирки центрифугировали при 13400 об/мин в течение 30 минут при комнатной температуре.
4. Слили надосадочную жидкость, добавили 1 мл 70 % этанола на стенку пробирки, инкубировали в течение 10 секунд.
5. Слили спирт, в пробирке с открытой крышкой высушили осадок в термостате при 55 °С в течение 15 минут или до испарения спирта.
6. Осадок ресуспендировали в 12 мкл формамида.
7. Ресуспендированный в формамиде продукт реакции терминаторов перенесли в прозрачный 96-луночный планшет в отдельные промаркированные лунки.
8. Плотно закрыли лунки планшета резиновой септой для 96-луночных планшетов.
9. Установили планшет на основание для планшета и зафиксировали фиксатором.

*Запуск генетического анализатора*

Для проведения капиллярного секвенировали использовали генетический анализатор 3130xl Genetic Analyzer (Applied Biosystems, США). Запуск прибора осуществляли в соответствии со стандартными рекомендациями производителя.

*Анализ результатов секвенирования*

Для анализа результатов секвенировали применяли встроенный программный пакет SeqScanner V.1.0. (Applied Biosystems, США).

**3.3. Статистический анализ**

Статистический анализ проводили с использованием ПО Prism 8.0 (GraphPad, США). Достоверность различий определяли с помощью непараметрического критерия Манна-Уитни. При p<0,05 различия считали достоверными. Непрерывные переменные представлены как среднее ± стандартная ошибка среднего (M±m).

# 4. Результаты и их обсуждение

**4.1. Характеристика исследуемых групп**

Возраст мужчин, включенных в исследование, составил от 27 до 50 (мин. возраст-27, макс. возраст-50, медиана-36). Для всех пациентов был проведен спермиологический анализ, результаты которого представлены в таблице 3. Согласно результатам спермограммы у 14 из 20 пациентов была нормозооспермия (70%), у 6 (30%) - тератозооспермия, то есть доля морфологически нормальных сперматозодиов была ниже 4%. Во всех исследуемых образцах концентрация и/или общее число сперматозодоидов были выше нормативных значений. Доля прогрессивно-подвижных сперматозодов лишь в одном случае была ниже нормативных значений, однако общая подвижность в данном образце была в норме (таблица 5).

Таким образом в исследуемой группе можно выделить следующие подгруппы:

согласно результатам спермограммы

* нормозооспермия (Н) (n=14);
* тератозооспермия (Т) (n=6);

согласно возрасту

* 45 лет и старше (n=3);
* моложе 45 (n=17)

Таблица 5. Результаты спермограммы: Н - нормозооспермия, Т - тератозооспермия.

В результате сбора и подготовки материала была создана коллекция криоконсервированных образцов эякулята от пациентов с тератозооспермия. Коллекция состоит из 12 образцов эякулята от 6 пациентов (ППО, УСХ, ТСБ, КИВ, ПНА, ДПБ). Также была сформирована коллекция “контрольных образцов” от пациентов с нормоозооспермией (28 образцов от 14 пациентов). Образцы хранятся долгосрочно в жидком азоте при -196 ℃.

|  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| № | Код пациента | Возраст | Объем,  мл | Концентрация сперматозойдов,  млн/мл | Общие количество сперматозов, млн | Прогрессивно-подвижные сперматозоиды, % | Морфологически нормальные сперматозоиды,  % | Заключение по результатам спермограммы |
| 1 | ППО | 27 | 4 | 194 | 776 | 65 | 3 | Т |
| 2 | ЖИА | 37 | 3 | 46 | 138 | 70 | 4 | Н |
| 3 | САА | 30 | 5 | 64 | 320 | 75 | 6 | Н |
| 4 | ЭП | 35 | 4 | 155 | 620 | 47 | 9 | Н |
| 5 | УСХ | 34 | 5 | 11 | 55 | 60 | 1 | Т |
| 6 | БАК | 36 | 3 | 97 | 291 | 71 | 8 | Н |
| 7 | ФВН | 39 | 2,5 | 226 | 565 | 70 | 6 | Н |
| 8 | МАВ | 47 | 3 | 115 | 345 | 61 | 8 | Н |
| 9 | ДСС | 45 | 4 | 206 | 824 | 81 | 6 | Н |
| 10 | ЗЛГ | 38 | 4 | 251 | 1004 | 80 | 4 | Н |
| 11 | ТСБ | 40 | 3,5 | 37 | 129 | 62 | 1 | Т |
| 12 | АСИ | 38 | 5 | 143 | 715 | 74 | 5 | Н |
| 13 | СМА | 31 | 4 | 276 | 1104 | 56 | 8 | Н |
| 14 | ЗВП | 42 | 2 | 57 | 114 | 61 | 5 | Н |
| 15 | ГИВ | 27 | 3,5 | 162 | 567,5 | 60 | 9 | Н |
| 16 | ТЗЗ | 32 | 3,5 | 155 | 542 | 69 | 6 | Н |
| 17 | КИВ | 50 | 6,5 | 29 | 188,5 | 54 | 3 | Т |
| 18 | ПНА | 37 | 4,5 | 30 | 135 | 22 | 2 | Т |
| 19 | БФС | 28 | 4,5 | 224 | 1008 | 77 | 7 | Н |
| 20 | ДПБ | 38 | 2,5 | 38 | 95 | 44 | 0 | Т |

Планируется продолжить пополнение коллекций, также создать коллекции с другими патологическими состояниями эякулята (олигозооспермия, астенозооспермия и др.). Данные коллекции могут послужить основой для многих биомедицинских исследований в области мужского репродуктивного здоровья.

**4.2. Оценка и сравнение качества полученной ДНК из образцов эякулята**

После выделения ДНК была проведена проверка параметров качества геномной ДНК (концентрация, чистота, целостность). Полученные результаты проверки показали, что все образцы имеют качество ДНК в допустимых нормах (A260/A280 > 1,8; DIN > 7,5; C > 50 нг/мкл). Средние значения представлены в сводной таблице 6. На рисунке 1 представлена электрофореграмма образца КИВ после криоконсервации, средняя длина фрагмента более 60000 пар нуклеотидов, что свидетельствует об отсутствии фрагментации полученного образца ДНК.

Таблица 6. Результаты проверки качества ДНК.

|  |  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| ДНК | Концентрация (M±m), нг/мкл | p-значение (Концентрация) | Соотношение A260/A280 (M±m) | p-значение (A260/A280) | DIN (M±m) | p-значение (концентрации) |
| До криоконсервации | 266±35 | 0,44 | 1,88±0,12 | 0,89 | 9,3±0,1 | 0,63 |
| После криоконсервации | 232±32 | 1,90±0,10 | 9,5±0,4 |

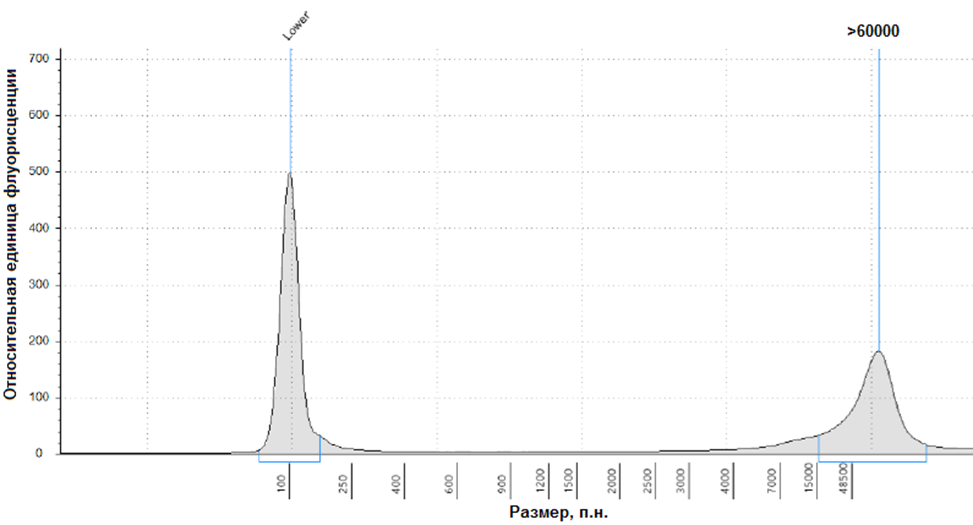


Рисунок 1. Электрофореграмма тотальной выделенной ДНК (образец КИВ после криоконсервации)

После проведенной криоконсервации проверка качества ДНК показала незначительное уменьшение концентрации ДНК - 232±32. Значение p-value для показателей концентрации составило 0,63, что подтверждает, что статистических различий нет. Также проверка на целостность молекулы ДНК (DIN - DNA Integrity Number) показала, что молекула целостна, не деградированная (9,5±0,4).

Фрагментация ДНК, как один из основных показателей качества эякулята, в программах ВРТ оценивается методами TUNEL, SCSA, COMET и др. [26]. Влияние криоконсервации на повреждение ДНК, оцененное такими методами, до сих пор вызывает противоречия [27], но в данных методах оценивается фрагментация ДНК в первичном материале (до этапа выделения ДНК). В свою очередь, для проведения молекулярно-генетических исследований важным параметром является целостность ДНК полученной в результате экстракции. Данных по влиянию криконсервации спераматозоидов на число целостности ДНК найдено не было, но было показано, что криоконсервация отрицательно влияет на целостность ДНК, выделенной из других типов биоматериала, таких как лейкоцитарная пленка, опухолевые ткани [28]. Текущее исследование показало, что криоконсервация и хранение до 6 месяцев в жидком азоте не влияет на целостность ДНК. Далее планируется провести оценку качества ДНК после более длительного хранения.

Исходя из полученных данных можно утверждать, что криоконсервация не вносит изменения и не способствует разрушению молекулы ДНК, что могло бы повлиять на результаты дальнейшего исследования. Средняя длина фрагментов ДНК образцов подверженных криоконсервации и свежего натива составила более 60 тыс.п.н.

**4.3. Подбор праймеров**

В ходе работы нами были подобраны праймеры к CpG богатому фрагменту промотора гена *H19*. Был выбран фрагмент с максимальным числом - 18 CpG-сайтами с использованием базы Ensembl, праймеры были подобраны с помощью программного обеспечения MethPrimer (см. рис. 2).

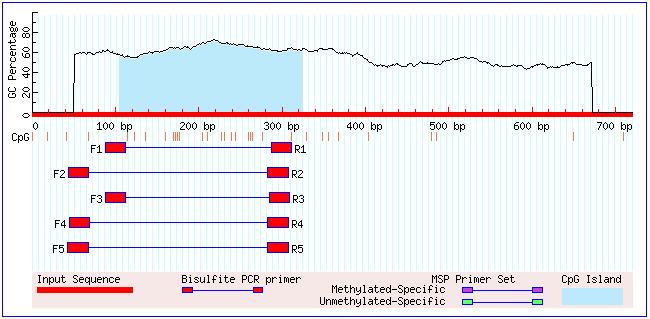


Рисунок 2. Фрагмент промоторной части гена *H19* в ПО MethPrimer

Далее нами была проведена оценка праймеров путем проведения ПЦР и дальнейшей визуализацией результата ПЦР методом электрофореза в полиакриламидном геле. Также были подобраны оптимальные условия проведения ПЦР для каждой пары праймеров.

Из 5-ти пар подобранных праймеров были выбраны праймеры №3 (см. табл. 3), в соответствии со следующими критериями: наличие четкого продукта амплификации, отсутствие неспецифичных фрагментов, соответствие длине выбранного фрагмента (224 п.н.) (см. рис. 3).

Таблица 3. Праймеры к фрагменту гена H19 богатому CpG-сайтами.

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| Праймер  № (Tm, °С) | прямой | обратный |
| **3 (60°С)** | **5’-TAGGGTTTTTGGTAGGTATAGAGTT-3’** | **5’-CCATAAATATCCTATTCCCAAA-3’** |

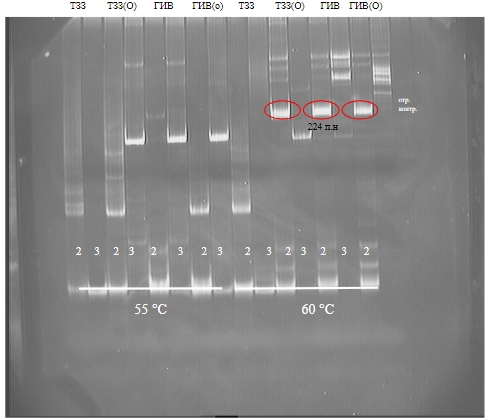


Рисунок 3. Электрофореграмма ПЦР продуктов образцов ДНК пациентов ГИВ, ГИВ(о), ТЗЗ, ТЗЗ(о) с двумя парами праймеров №2 и №3 при температурах 55ºС и 60 ºС (о - образец после криоконсервации).

Оптимальные условия для проведения ПЦР с праймерами №3:

1. Начальная денатурация: 95 ºС – 3 мин;

2. Основной цикл (50 циклов):

Денатурация: 94 ºС – 30 с;

Отжиг праймеров:60 ºС – 30 с;

Синтез: 72 ºС – 1 мин;

3. Завершающий синтез: 72 ºС – 20 мин.

Подобранные праймеры специфичны только к конвертированной последовательности ДНК, таким образом, наличие продукта амплификации является контролем успешного проведения бисульфитной конверсии.

**4.4. Результаты проведенного бисульфитного секвенирования**

В рамках пилотного исследования нами было проведено секвенирование гена *Н19* модифицированный бисульфитной конверсией с помощью метода капиллярного секвенирования по Сэнгера с использованием одной пары образцов (ГИВ, ГИВ(о)).

Были получены следующие прочтения:

AAACGAACTCGAACTGCGAACTATAATATATTTTCCTACACTACCGCCACGCGACCACTTCCGATTCCACAACTACAACCAATTCCGTACCATCCAAACGATAAAACCGAAAAAAAAACCTCCAAAAATACCCATATACTATACAAAAACCCCCGAACTCTATACCTACCAAAAACCC - последовательность ДНК нативного образца ГИВ в результате бисульфитного секвенирования (рисунок 4);

AAACGAACTCGAACTGCGAACTATAATATATTTTCCTACACTACCGCCACGCGACCACTTCCGATTCCACAACTACAACCAATTCCGTACCATCCAAACGATAAAACCGAAAAAAAAACCTCCAAAAATACCCATATACTATACAAAAACCCCCGAACTCTATACCTACCAAAAACCC - последовательность ДНК образца ГИВ после криоконсервации в результате бисульфитного секвенирования (рисунок 5).

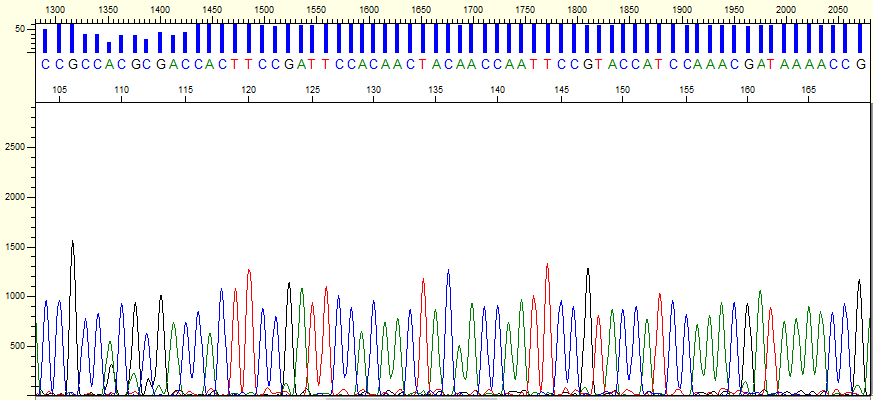


Рисунок 4. Хроматограмма ДНК образца ГИВ

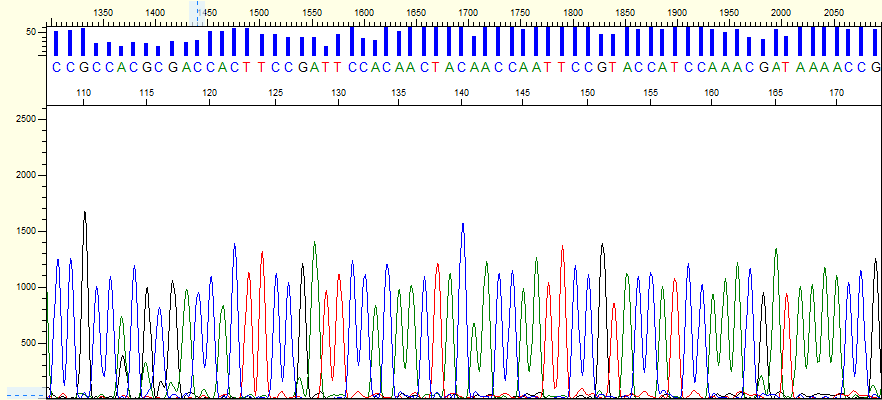


Рисунок 5. Хроматограмма ДНК образца ГИВ, подверженному криоконсервации

Референсную последовательность (ENSG00000130600) изучаемого фрагмента получили из базы данных Ensemble (<http://www.ensembl.org/>): GGGTCTCTGGCAGGCACAGAGCCCGGGGGCTCTTGCATAGCACATGGGTATTTCTGGAGGCTTCTCCTTCGGTCTCACCGCCTGGATGGCACGGAATTGGTTGTAGTTGTGGAATCGGAAGTGGCCGCGCGGCGGCAGTGCAGGCTCACACATCACAGCCC.

Для сравнения с исходной последовательностью изучаемого фрагмента получили комплементарную последовательность, так как сиквенс был получен с обратной цепи:

GGGTTTTTGGTAGGTATAGAGTTCGGGGGTTTTTGTATAGTATATGGGTATTTTTGGAGGTTTTTTTTTCGGTTTTATCGTTTGGATGGTACGGAATTGGTTGTAGTTGTGGAATCGGAAGTGGTCGCGCTCGGTAGTGTAGGTTTATATATTATAGTTCGAGTTCGTTT **-** сиквенс, полученный в результате секвенирования (обратный и комплементарный). Голубым выделены метилированные CpG - сайты, красным - неметилированный сайт.

Отличий между первичным образцом и после криоконсервации в профиле метилирования обнаружено не было. Из 11 исследуемых CpG-сайтов 10 были метилированы.

При сравнении референсного и полученного комплементарного сиквенса было выявлено, что 10 из 11 CpG-сайтов на полученной последовательности были метилированы. По полученным данным видно, что криоконсервация никак не повлияла на профиль ДНК метилирования гена *Н19* образца, подверженному криоконсервации. Мы можем предположить, что криоконсервация не влияет на ДНК метилирование. Для проверки данного предположения исследование стоит проводить на больших выборках с различными локусами генов, подверженных метилированию в сперматозоидах человека. Изучение влияния криоконсервации на ДНК метилирование сперматозоидов стоит проводить с большей выборкой, также учитывая группы с различными патологиями эякулята. Так как, известно, что при бесплодии наблюдается низкий уровень метилирования гена H19 в сперматозоидах человека [23]. При этом роль криоконсервации не было выявлено, что дает право продолжать исследования, в целях исследования влияния криоконсервации как причины мужского бесплодия.

# 5. Выводы

На основании полученных результатов были сформулированы следующие выводы:

1. Освоены методы характеризации, криоконсервации и разморозки эякулята, метод бисульфитного секвенирования;
2. Создана коллекция криозамороженных образцов сперматозоидов пациентов с тератозооспермией с 12 образцами от 6 пациентов, создана коллекция “контрольных” образцов сперматозоидов (2 образцов от 14 пациентов). Все образцы были охарактеризованы стандартным спермиологическим анализом.
3. Криоконсервация не влияет на качество ДНК: концентрация ДНК после криоконсервации - (232±32) нг/мкл, соотношение A260/A280 - 1,90±0,10, число целостности DIN - 9,5±0,4.
4. Подобраны оптимальные условия проведения амплификации дифференциально метилированной области гена *H19*, содержащей максимальное число CpG сайтов. Пилотное сравнение профилей метилирования ДНК фрагмента промотора гена *H19* не выявило отличие между нативным и криоконсервированным материалом

# 6. Благодарность

Автор выражает благодарность Р. А. Илларионову за помощь на всех этапах работы, Е.М. Комаровой за помощь на этапах оценки и криоконсервировании материала, а также за предоставленные материалы к работе, З.Н. Тонян за помощь в обучении и проведении капиллярного секвенирования по Сэнгеру.

# 7. Список литературы

1. Т.В. Яковлева; Вспомогательные репродуктивные технологии и искусственная инсеминация, клинические рекомбинации (2011)
2. Азизов А.П., Саидов М.С. Мужское бесплодие. Махачкала 2010
3. Русанова Н. Е. Вспомогательные репродуктивные технологии в России: медицинские прорывы и общественные проблемы //Население и экономика. – 2020. – Т. 4. – №. 4. – С. 5.
4. Khosravizadeh Z. et al. The effect of cryopreservation on DNA methylation patterns of the chromosome 15q11–q13 region in human spermatozoa //Cell and Tissue Banking. – 2020. – Т. 21. – С. 433-445.
5. Терентьева Л. С. и др. Диагностика и лечение бесплодия: методическое пособие //Бишкек: Изд-во КРСУ. – 2005.
6. Hazlina N. H. N. et al. Worldwide prevalence, risk factors and psychological impact of infertility among women: a systematic review and meta-analysis //BMJ open. – 2022. – Т. 12. – №. 3. – С. e057132..
7. A.A. Sukhakov. Epidemiology of female infertility and the experience of recovery of reproductive function in patients with chronic endometritis in the tyumen region (2023)
8. Savina A. A., Zemlyanova E. V., Feiginova S. I. Potential births loss due to male and female infertility in Moscow.[Poteri potencial'nyh rozhdenij v g. Moskve za schet zhenskogo i muzhskogo besplodiya]. Zdorov'e megapolisa. 2022; 3 (3): 39–45 //Russ.). https://doi. org/10.47619/2713-2617. zm. – 2022. – Т. 3. – С. 39-45.
9. Серова В. Н., Сухих Г. Т. Акушерство и гинекология: Клинические рекомендации //М.: ГЭОТАР-Медиа. – 2014.
10. Кулаков В. И., Сухих Г. Т., Назаренко Т. А. Бесплодный брак. Современные подходы к диагностике и лечению: руководство для врачей. – ГЭОТАР-Медиа, 2010.
11. Руководство В. О. З. по исследованию и обработке эякулята человека. Пятое издание //Макарова НП, Научный редактор д. б. н., проф. ЛФ Курило. – 2012.
12. Ранние репродуктивные потери : руководство для врачей / под ред. О. Н. Беспаловой, И. Ю. Когана. — Москва : ГЭОТАР-Медиа, 2024. — 464 с. : ил.
13. Tüttelmann F. et al. Clinical experience with azoospermia: aetiology and chances for spermatozoa detection upon biopsy //International journal of andrology. – 2011. – Т. 34. – №. 4pt1. – С. 291-298.
14. Edgar D.H., Gook D.A. A critical appraisal of cryopreservation (slow cooling versus vitrification) of human oocytes and embryos // Hum. Reprod. Update. (2012). Vol. 18. P. 536-554.
15. Вспомогательные репродуктивные технологии и искусственная инсеминация. Клинические рекомендации (протокол лечения)
16. О.В. Быстрова Способы восстановления фертильности у онкологических больных;
17. World Health Organization et al. WHO laboratory manual for the examination and processing of human semen. – World Health Organization, 2021.
18. Zaikina E.V. 1 , Goncharova A.S. REVIEW OF MODERN METHODS OF CRYOPRESERVATION OF VARIOUS TYPES OF BIOLOGICAL MATERIAL.-2022 P.129-129. DOI:10.17513/spno.31790
19. Bhattacharya S. Cryoprotectants and their usage in cryopreservation process //Cryopreservation Biotechnology in Biomedical and Biological Sciences,-2018. – 2018. +
20. Федорин Д. Н., Епринцев А. Т. Метилирование ДНК как способ регуляции экспрессии генов //ФГБОУ ВО «Воронежский государственный университет» Вестник ВГУ, Серия: химия, биология, фармация. – 2022. – №. 2.
21. Kläver R. et al. Routine cryopreservation of spermatozoa is safe—evidence from the DNA methylation pattern of nine spermatozoa genes //Journal of assisted reproduction and genetics. – 2012. – Т. 29. – С. 943-950.
22. El Hajj N. et al. Methylation status of imprinted genes and repetitive elements in sperm DNA from infertile males //Sexual Development. – 2011. – Т. 5. – №. 2. – С. 60-69. +
23. Егорова Д. А. и др. Роль эпигенетики в мужском и женском бесплодии //Акушерство, Гинекология и Репродукция. – 2024. – Т. 18. – №. 1. – С. 68-82.;
24. Касьянов Г.И., Сязин И.Е Криообработка: учебное пособие. Экоинвест, (2014).
25. Li L. C., Dahiya R. MethPrimer: designing primers for methylation PCRs //Bioinformatics. – 2002. – Т. 18. – №. 11. – С. 1427-1431.
26. Chatzimeletiou, K., Fleva, A., Nikolopoulos, T. T., Markopoulou, M., Zervakakou, G., Papanikolaou, K., Anifandis, G., Gianakou, A., & Grimbizis, G. (2023). Evaluation of Sperm DNA Fragmentation Using Two Different Methods: TUNEL via Fluorescence Microscopy, and Flow Cytometry. Medicina (Kaunas, Lithuania), 59(7), 1313.
27. Di Santo, M., Tarozzi, N., Nadalini, M., & Borini, A.. Human Sperm Cryopreservation: Update on Techniques, Effect on DNA Integrity, and Implications for ART. Advances in urology, 2012, 854837.
28. Neuber, A. C., Komoto, T. T., da Silva, E. C. A., Duval, V. D. S., Scapulatempo-Neto, C., & Marques, M. M. C. (2023). Quality Assessment of Cryopreserved Human Biological Samples from the Biobank of Barretos Cancer Hospital. Biopreservation and biobanking, 21(1), 74–80.