

© ^{1,2}Жилкова Е. С., ¹Феськов А. М., ²Федота А. М., ¹Блажко Е. В.

УДК 577.21:577.218

^{1,2} Жилкова Е. С., ¹ Феськов А. М., ² Федота А. М., ¹ Блажко Е. В.

АНАЛИЗ ПОЛИМОРФНЫХ ВАРИАНТОВ G919A И A2039G ГЕНА *FSHR* У МУЖЧИН СО СНИЖЕННОЙ ФЕРТИЛЬНОСТЬЮ В ВОСТОЧНО-УКРАИНСКОЙ ПОПУЛЯЦИИ

¹ Центр репродукции человека «Клиника профессора Феськова А. М.» (г. Харьков)

² Харьковский национальный университет имени В.Н. Каразина (г. Харьков)

zhilkova@feskov.com.ua

afedota@mail.ru

Данная работа является фрагментом НИР «Изучение клинико-патогенетических механизмов развития недифференцированной дисплазии соединительной ткани в ремоделировании эластично-тканых структур организма человека», № гос. регистрации 01 12U001027.

Вступление. В настоящее время с проблемой бесплодия сталкиваются около 10-15% супружеских пар, при этом практически 50% случаев обусловлено нарушением репродуктивной функции мужчины, в 20% – нарушением репродуктивной функции обоих супругов [1,2]. В 32% случаев идиопатическое бесплодие у мужчин обусловлено генетическими факторами [3,4].

Нарушение компактизации хроматина в ядрах сперматозоидов, или фрагментация ДНК, по мнению ряда авторов, относительно недавно выявленная возможная причина снижения фертильности у мужчин [5-7]. Разрывы ДНК, выявляемые в эякуляторных сперматозоидах, могут являться следствием нарушения их созревания в процессе сперматогенеза. Мутации генов, контролирующих этапы сперматогенеза, могут приводить к нарушениям подвижности, морфологических и фертильных свойств сперматозоидов, которые проявляются в диапазоне от легкого нарушения сперматогенеза до полного отсутствия половых клеток в семенных канальцах (синдром «только клеток Сертоли») [8-10]. Известно, что основные гормоны, влияющие на процесс формирования и созревания сперматозоидов – это фолликулостимулирующий гормон (ФСГ), лютеинизирующий гормон (ЛГ) и тестостерон. Фолликулостимулирующий гормон вырабатывается гипофизом и хотя сам по себе не индуцирует сперматогенез, но необходим для формирования зрелых сперматозоидов в количестве, достаточном для оплодотворения. Важность ФСГ в поддержании репродуктивных функций

организма определяется его бета-субъединицей, обусловленной геном фолликулостимулирующего гормона *FSHB* (follicle stimulating hormone gene, beta polypeptide, 11p13) [11]. Ген рецептора к фолликулостимулирующему гормону *FSHR* (follicle stimulating hormone receptor gene, 2p21) определяет рецепторы к ФСГ, расположенные на поверхности клеток яичников и тестикул [12].

В настоящее время у женщин и у мужчин исследовано около полутора десятков полиморфных вариантов гена *FSHR*, ассоциированных с нарушениями репродуктивной функции, с изменением гормонального профиля (увеличение уровня ФСГ, снижение уровня прогестерона), снижением концентрации сперматозоидов в семенной жидкости. Эффекты однонуклеотидных замен в гене *FSHR* рассматриваются также в связи с разработкой схем использования больших доз гормональных препаратов для дополнительной стимуляции яичников при проведении ЭКО [13,14]. Показана роль отдельных аллелей полиморфных вариантов G919A и A2039G, расположенных в экзоне 10 гена *FSHR*, в регуляции сперматогенеза и развитии овариальных фолликулов и синтезе эстрогена [13-15].

Цель исследования. Целью данной работы стало исследование связи между нарушением целостности ДНК сперматозоидов в процессе сперматогенеза и полиморфными вариантами G919A (Ala307Thr) и A2039G (Asn680Ser) гена *FSHR* у мужчин со сниженной репродуктивной функцией в восточно-украинской популяции, поскольку литературные данные о связи однонуклеотидных замен в гене *FSHR* с мужской фертильностью неоднозначны.

Объект и методы исследования. Сбор первичной информации и лабораторные исследования проводились в Центре репродукции человека «Клиника профессора Феськова А.М.» (г. Харьков).

Материалом для молекулярно-генетического исследования послужили образцы периферической крови 71 мужчины в возрасте от 22 до 45 лет со сниженной репродуктивной функцией. Кариотипирование и молекулярно-генетическое исследование проведено для 71 пациента, определение степени фрагментации ДНК сперматозоидов в эякуляте проведено 60 мужчинам из 71. От всех участников исследования или их родственников было получено письменное согласие на участие в данной работе. Для проведения цитогенетических исследований препараты хромосом получали из лимфоцитов периферической крови по стандартной методике GTG-методом. Результаты цитогенетического исследования приведены согласно Международной системе номенклатуры цитогенетики человека [16].

Выделение ДНК проводилось с помощью наборов для экстракции ДНК «NucleoSpin Blood» (Германия). RT-PCR выполнена с использованием системы «ABI PRISM 7500 real-time PCR system» (США) и наборов для определения однонуклеотидных замен в гене *FSHR* по стандартной методике производителя [17,18].

Анализ фрагментации ДНК сперматозоидов проводился методом SCD («HaloSperm», «Halotech», Испания). Результат документирован с помощью программы «Lucia FISH» («LIM», Чехия). Согласно рекомендациям Европейской Ассоциации Урологов, содержание сперматозоидов в эякуляте, содержащих фрагментированную ДНК, в норме не должно было превышать 20,0% [19,20].

Проведен анализ дат на соответствие закону нормального распределения. Разница частот генотипов оценивалась с помощью ϕ -преобразования Фишера путём угловой трансформации. Исследование связи между признаками проведено с помощью корреляционного анализа. Проверка статистических гипотез об ассоциации изученных аллелей и генотипов с исследуемыми признаками и оценка равенства рядов распределения выполнена с помощью критерия χ^2 на уровнях значимости 0,05, 0,01 и 0,001 [16,21]. Рассчитаны относительный риск и доверительный интервал [22]. Расчёты выполнены с помощью пакета программ Statistica-6.

Результаты исследований и их обсуждение. Исследование показало, что у 11 мужчин из 71 обнаружена азооспермия, среди них 3 пациента являются гетерозиготами по мутации delF508 гена *CFTR*, три пациента имеют хромосомные аномалии – 45,XY,

rob(13;21)(q10;q10), 47,XXY[18]/46,XY[2], 47,XXY. У 60 мужчин, которым проведено исследование степени фрагментации ДНК в сперматозоидах эякулята, выявлен нормальный кариотип, 46,XY. Для дальнейшего анализа в исследуемой группе оставлены пациенты в возрасте не старше 35 лет (n=51), так как предыдущие исследования авторов показали влияние фактора возраста на степень фрагментации ДНК в сперматозоидах пробандов старше 35 лет [23].

Рассчитаны частоты аллелей и генотипов исследуемых полиморфных вариантов гена *FSHR* у мужчин со сниженной репродуктивной функцией. Статистически значимой разницы между частотами аллелей, распределением частот генотипов у пациентов общей выборки, выборки мужчин до 35 лет и выборки пациентов с азооспермией нет. При исследовании полиморфизма G919A гена *FSHR* частоты распределения аллелей составили: для общей группы (N=71) $P_G=0,697$ и $q_A=0,303$; для младшей группы (n=51) $P_G=0,726$ и $q_A=0,275$ соответственно. При исследовании полиморфизма A2039G гена *FSHR* частоты распределения аллелей составили: для общей группы (N=71) $P_A=0,739$ и $q_G=0,261$, для младшей группы (n=51) $P_A=0,775$ и $q_G=0,225$ соответственно.

На основании частот анализируемых аллелей получено теоретическое число генотипов для панмиксной популяции. Фактическое распределение генотипов полиморфного варианта G919A статистически значимо не отличается от теоретически ожидаемого при равновесии в группах пробандов N (df=2, $\chi^2_{ст}=5,99$, $\chi^2_{факт}=4,56$, $p>0,05$) и n (df=2, $\chi^2_{ст}=5,99$, $\chi^2_{факт}=2,28$, $p>0,05$). Фактическое распределение генотипов полиморфного варианта A2039G статистически значимо не отличается от теоретически ожидаемого при равновесии в группе пациентов n=51 (df=2, $\chi^2_{ст}=5,99$, $\chi^2_{факт}=3,69$, $p>0,05$) и значимо отличается в общей группе N=71 (df=2, $\chi^2_{ст}=5,99$, $\chi^2_{факт}=6,72$, $p<0,05$), однако статистически значимой разницы между отдельными частотами генотипов, например, $AG_{факт} - 26,8\%$ и $AG_{теор} - 38,0\%$ не отмечается (df=140, $t_{ст}=1,98$, $t_{факт}=1,61$, $p>0,05$) (таблица 1).

Полученные результаты, а также отсутствие статистически значимой разницы между частотами аллелей и генотипов фактическими и теоретически ожидаемыми, в исследуемых выборках и в группе мужчин с азооспермией показывают, что исследуемые генотипы в первом приближении не являются

Таблица 1.

Распределение генотипов полиморфных вариантов A2039G, G919A гена *FSHR*

Распределение		Генотипы, A2039G			Генотипы, G919A		
		AA	AG	GG	GG	GA	AA
		Количество (%)	Количество (%)	Количество (%)	Количество (%)	Количество (%)	Количество (%)
N=71	фактическое	43 (60,6)	19 (26,8)	9 (12,6)	38 (53,5)	23 (32,4)	10 (14,1)
	теоретическое	39 (55,0)	27 (38,0)	5 (7,0)	35 (49,3)	30 (42,2)	6 (8,5)
n=51	фактическое	33 (64,7)	13 (25,5)	5 (9,8)	29 (56,9)	16 (31,2)	6 (11,9)
	теоретическое	30 (60,0)	18 (35,0)	3 (5,0)	27 (52,7)	20 (39,9)	4 (7,4)

фактором, определяющим азооспермию. В то же время избыток гомозигот и недостаток гетерозигот свидетельствует о том, что locus может являться селективно значимым для изучаемой выборки.

Исследование степени фрагментации ДНК в сперматозоидах пробандов с разными генотипами показало, что у пациентов с альтернативным аллелем в гомо- или гетерозиготном состоянии степень фрагментации ДНК статистически значимо выше, чем у пациентов-гомозигот по базовому аллелю.

При сравнении среднего уровня фрагментации ДНК спермы у носителей альтернативного аллеля G919A в гомо- или гетерозиготном состоянии: $U_{\text{эмп}}=80,5$ ($U_{\text{крит}}=196$, $p<0,01$). При сравнении среднего уровня фрагментации ДНК спермы у носителей альтернативного аллеля A2039G в гомо- или гетерозиготном состоянии: $U_{\text{эмп}}=105$ ($U_{\text{крит}}=178$, $p<0,01$). Количество мужчин со степенью фрагментации ДНК выше 20% также значимо больше среди гомозигот по альтернативному аллелю и среди гетерозигот (табл. 2).

Коэффициент корреляции по Спирмену между количеством альтернативных аллелей исследуемых полиморфных вариантов гена *FSHR* в генотипе пробандов и средней степенью фрагментации ДНК в сперматозоидах составил $0,70 \pm 0,10$ (табл. 3).

Для прогнозирования вероятности увеличения степени фрагментации ДНК в сперматозоидах пациентов для каждого генотипа вычислено отношение шансов (OR) и 95% доверительный интервал (CI). Для гетерозигот GA по полиморфному варианту G919A риск развития высокой степени фрагмен-

тации ДНК увеличивается в 16 раз (OR=15,83, 95% CI 3,50-71,54, $p<0,05$), для гомозигот AA – в 28 раз (OR=27,76, 95% CI 3,33-231,70, $p<0,05$) по сравнению с гомозиготами по базовому аллелю. Для гетерозигот AG и для гомозигот GG по полиморфному варианту A2039G риск развития высокой степени фрагментации ДНК увеличивается в 16 раз (OR=15,55, 95% CI 3,42-70,76, $p<0,05$; OR=15,55, 95% CI 1,98-122,15, $p<0,05$) по сравнению с гомозиготами по базовому аллелю.

Выводы. Анализ полученных данных позволяет предположить, что носительство альтернативных аллелей по полиморфным вариантам G919A и A2039G гена *FSHR* является фактором риска развития высокой степени фрагментации ДНК (>20%) в сперматозоидах у мужчин до 35 лет с нарушениями фертильности. Доказана положительная корреляция между количеством альтернативных аллелей исследуемых полиморфных вариантов гена *FSHR* в генотипе пробандов и средней степенью фрагментации ДНК в сперматозоидах.

Перспективы дальнейших исследований. Известно, что сперматозоиды даже со значительными повреждениями ДНК сохраняют способность оплодотворять ооциты, но дальнейшее формирование таких бластоцист и имплантация могут быть блокированы на разных этапах развития [21,24,27]. В связи с этим понимание предпосылок повышения степени фрагментации ДНК в сперматозоидах у мужчин позволит снизить репродуктивные потери при проведении программ экстракорпорального оплодотворения.

Таблица 2.

Фрагментация ДНК спермы для разных генотипов полиморфного варианта G919A и A2039G в *FSHR* в младшей группе

SNP	Генотипы	N (%)	Средний возраст, $x \pm m_x$	Степень фрагментации ДНК, %	Количество мужчин с фрагментацией ДНК > 20%
G919A	GG	29 (56,9)	30,2±2,5	11,7±5,7	3 (10,3*)
	GA	16 (31,2)	30,6±1,8	26,2±8,8	11 (68,8*)
	AA	6 (11,9)	31,8±2,6	36,5±16,2	5 (83,3)
A2039G	AA	33 (64,7)	30,1±2,3	13,9±6,9	5 (15,2**)
	AG	13 (25,5)	31,3±2,2	25,6±8,4	10 (76,9**)
	GG	5 (9,8)	31,4±2,7	39,3±17,2	4(80)
Статистики	*df=2, $\chi^2_{\text{ст}}=13,82$, $\chi^2_{\text{факт}}=16,41$, $p<0,001$				
Статистики	**df=2, $\chi^2_{\text{ст}}=13,82$, $\chi^2_{\text{факт}}=16,19$, $p<0,001$				

Таблица 3.

Степень фрагментации ДНК сперматозоидов пациентов с разными генотипами по полиморфным вариантам G919A и A2039G гена *FSHR*

Генотипы		GGAA	GGAG	GAAA	GAAG	AAAA	AAGG
n=51	Количество	26	3	6	10	1	5
	Средний возраст, $x \pm m_x$	29,9±2,5	32,7±1,8	30,5±1,2	30,6±2,2	34,0±0,0	31,4±2,7
	Степень фрагментации ДНК, %	10,7±5,1	20,3±7,1	24,5±8,7	27,6±8,6	22,5±0,0	39,3±17,2
	Кол-во пациентов со степенью фрагментации ДНК выше 20%	1 (3,9%)	2 (66,7%)	3 (50,0%)	8 (80,0%)	1 (100%)	4 (80,0%)
Статистики df=3, $r_s = 0,70 \pm 0,10$, $p<0,01$							

Литература

1. Атраментова Л. О. Статистичні методи в біології [Текст]: підруч. для студентів біолог. спец. вищих навч. закладів / Л. О. Атраментова, О. М. Утевська. – Харьков : [б. в.], 2007. – 286 с. – Б. ц.
2. Вартанян Э. В. Генетические факторы мужского бесплодия / Э. В. Вартанян, А. Н. Петрин, Т. Р. Курносов // Проблемы репродукции. – 2010. – № 2. – с. 74 – 78.
3. Воробьева О. А. Мужское бесплодие и нарушение структурной организации хроматина сперматозоидов. Существует ли связь? / О. А. Воробьева, А. В. Воскресенская, А. А. Одинцов, М. В. Филатов // Проблемы репродукции. – 2005. – № 6. – С. 56 – 62.
4. Долгов В. В. Лабораторная диагностика мужского бесплодия / В. В. Долгов, С. А. Луговская, Н. Д. Фанченко- М. : Триада, 2006. – 145 с.
5. Курило Л. Ф. Структура наследственных нарушений репродуктивной системы / Л. Ф. Курило, Л. В. Шилейко, Т. М. Сорокина, Е. М. Гришина // Вест РАМН. – 2000. – № 5. – с. 32 – 36
6. Лівшиць Г. Б. Молекулярно-генетичне дослідження порушень природної та стимульованої овуляції / Г. Б. Лівшиць, С. А. Кравченко, П. Ф. Татарський, І. А. Судома, Л. А. Лівшиць // Цитология и генетика. – 2008. – Т.2, № 42. – с. 63 – 69.
7. Тарасова М. Н. К диагностике нарушений репродуктивной функции мужчин / М. Н. Тарасова // Проблемы репродукции. – 2008. – № 5. – с. 52 – 55.
8. Федорова И. Д. Генетические факторы мужского бесплодия / И. Д. Федорова, Т. В. Кузнецова // Журнал акушерства и женских болезней. – 2007. – №1. – с. 64 – 72.
9. Феськов А. М. Исследование связи между нарушением компактизации хроматина и наличием анеуплоидий в ядрах сперматозоидов у мужчин со сниженной фертильностью / А. М. Феськов, Е. С. Жилкова, А. М. Федота, Н. Н. Сотник // Вестник ХНУ имени В.Н. Каразина. Серия: Биология. – 2013. – Т.17, № 1056. – с. 89 – 94.
10. Agarwal A. Role of sperm chromatin abnormalities and DNA damage in male infertility / A. Agarwal, T.M. Said // Hum Reprod. – 2003. – Vol. 4, № 19. – P. 331 – 345.
11. Ahmadi A. Fertilizing ability of DNA-damaged spermatozoa / F. Ahmadi, S.C. Ng // J Exp Zool. – 1999. – № 284. – P. 696 – 704.
12. Aittomaki K. Mutation in the follicle-stimulating hormone receptor gene causes hereditary hypergonadotropic ovarian failure / K. Aittomaki, J. L. D. Lucena, P. Pakarinen, P. Sistonen, J. Tapanainen, J. Gromoll, R. Kaskikari, E.M. Sankila, H. Lehtvaslaiho, A.R. Engel, E. Nieschlag, I. Huhtaniemi, A. de la Chapelle // Cell. – 1995. – № 82. – P. 959 – 968.
13. Armitage P., Berry G. Statistical methods in medical research. 3rd ed / P. Armitage, G. Berry.-Boston : Blackwell Scientific Publications, 1994. – 620 p.
14. Calle J. F. Sperm deoxyribonucleic acid fragmentation as assessed by the sperm chromatin dispersion test in assisted reproductive technology programs: results of a large prospective multicenter study / J. F. Calle, A. Muller, M. Walschaerts // Fertility and Sterility. – 2008. – Vol.6, №19. – P. 671 – 682.
15. Cayli S. Cellular maturity and apoptosis in human sperm: creatin kinase, caspase-3 and Bcl_{xL} levels in mature and diminished maturity sperm / S. Cayli, D. Sakkas, L. Vigue, R. Demir, G. Huszar // Mol. Hum. Reprod. – 2004. – Vol.5, №10. – P. 365 – 372.
16. Dohle G. R. European Association of Urology Working Group on Male Infertility [Электронный ресурс] / G. R. Dohle, T. Diemer, Z. Kopa. – Eur Urol, 2014. – Режим доступа : http://uroweb.org/wp-content/uploads/17-Male Infertility_LR.pdf.
17. Foresta C. Y chromosome microdeletions and alterations of spermatogenesis / C. Foresta // Endocr. Rev. – 2001. – № 22. – P. 226 – 239.
18. Henkel R. DNA fragmentation of spermatozoa and assisted reproduction technology / R. Henkel, E. Kierspel, M. Hajimohammad // Reprod Biomed Online. – 2003. – № 7. – P. 477 – 484.
19. Hong Ye. Relationship between human sperm-hyaluronan binding assay and fertilization rate in conventional in vitro fertilization / Ye Hong, H. Guoning, Yang Gao, De Yi Liu // Hum. Reprod. – 2006. – Vol.6, № 21. – P. 1545 – 1550.
20. Lisa G. Shaffer. ISCN 2009 An International System for Human Cytogenetic Nomenclature / Lisa G. Shaffer, Marilyn L. Slovak, Lynda J. Campbell. – S: Karger, 2009. – 138 p.
21. Luke S. Clinical significance of sperm DNA damage in assisted reproduction outcome / S. Luke, B. Gunnar, M. Stevenson, D. Lutton // Hum Reprod. – 2010. – Vol. 7, № 25. – P. 1594 – 1608.
22. Minegishi T. Cloning and sequencing of human FSH receptor cDNA / T. Minegishi, K. Nakamura, Y. Takakura, Y. Ibuki, M. Igarashi // Biochem. Biophys. Res. Commun. – 1991. -№ 175. – P. 1125 – 1130.
23. Oleszczuk K. Intra-individual variation of the sperm chromatin structure assay DNA fragmentation index in men from infertile couples / K. Oleszczuk, A. Giwercman, M. Bungum // Hum Reprod. – 2011. – Vol. 12, № 26. – P. 3244 – 3248.
24. Seli E. Spermatozoa nuclear determinants of reproductive outcome: implications for ART / E. Seli, D. Sakkas // Hum Reprod Update. – 2005. – Vol. 4, № 11. – P. 337 – 349.
25. Speyer B.E. Fall in implantation rates following ICSI with sperm with high DNA fragmentation / B. E. Speyer, A. R. Pizzey, M. Ranieri, R. Joshi, J.D.A. Delhanty, P. Serhal // Hum Reprod. – 2012. – Vol.7, № 25. – P. 1609 – 1618.
26. Tapanainen J.S. Men homozygous for an inactivating mutation of the follicle-stimulating hormone (FSH) receptor gene present variable suppression of spermatogenesis and fertility / J. S. Tapanainen, K. Aittomaki, J. Min, T. Vaskivuo, I. T. Huhtaniemi // Nature Genet. – 1997. – № 15. – P. 205 – 206.
27. Tesarik J. Paternal effects acting during the first cell cycle of human preimplantation development after ICSI / J. Tesarik, C. Mendoza, E. Greco // Hum Reprod. – 2002. – №17. – P. 184 – 189.
28. Watkins P.C. DNA sequence and regional assignment of the human follicle-stimulating hormone beta-subunit gene to the short arm of human chromosome 11 / P.C. Watkins, R. Eddy, A. K. Beck, V. Vellucci, B. Leverone, R. E. Tanzi, J. F. Gusella, T.B. Shows // DNA. – 1987. – № 6. – P. 205 – 212.

УДК 577.21:577.218

АНАЛІЗ ПОЛІМОРФНИХ ВАРІАНТІВ G919A ТА A2039G ГЕНУ *FSHR* У ЧОЛОВІКІВ ЗІ ЗНИЖЕНОЮ ФЕРТИЛЬНІСТЮ У СХІДНОУКРАЇНСЬКІЙ ПОПУЛЯЦІЇ

Жилкова Є. С., Феськов О. М., Федота О. М., Блажко О. В.

Резюме. Досліджено зв'язок між поліморфними варіантами G919A й A2039G гену *FSHR* та фрагментацією ДНК сперматозоїдів в процесі сперматогенезу у чоловіків. Ризик розвитку високого ступеню фрагмен-

тації ДНК вищий для гетерозигот GA по поліморфному алелю G919A у 16 разів, для гомозигот AA – у 28 разів, для гетерозигот AG та для гомозигот GG по поліморфному варіанту A2039G – у 16 разів у порівнянні з гомозиготами по базовому алелю. Носійство альтернативних алелей по поліморфним варіантам G919A й A2039G гена *FSHR* є фактором ризику розвитку високого ступеню фрагментації ДНК (>20%) у сперматозоїдах у чоловіків молодше 35 років з порушенням фертильності.

Ключові слова: фрагментація ДНК, *FSHR*, G919A, A2039G, фертильність.

УДК 577.21:577.218

АНАЛИЗ ПОЛИМОРФНЫХ ВАРИАНТОВ G919A И A2039G ГЕНА *FSHR* У МУЖЧИН СО СНИЖЕННОЙ ФЕРТИЛЬНОСТЬЮ В ВОСТОЧНО-УКРАИНСКОЙ ПОПУЛЯЦИИ

Жилкова Е. С., Феськов А. М., Федота А. М., Блашко Е. В.

Резюме. Исследована связь между полиморфными вариантами G919A и A2039G гена *FSHR* и нарушением целостности ДНК сперматозоидов в процессе сперматогенеза у мужчин. Риск развития высокой степени фрагментации ДНК выше для гетерозигот GA по полиморфному варианту G919A в 16 раз, для гомозигот AA – в 28 раз, для гетерозигот AG и для гомозигот GG по полиморфному варианту A2039G – в 16 раз по сравнению с гомозиготами по базовому алелю. Носительство альтернативных алелей по полиморфным вариантам G919A и A2039G гена *FSHR* является фактором риска развития высокой степени фрагментации ДНК (>20%) в сперматозоидах у мужчин до 35 лет с нарушениями фертильности.

Ключевые слова: фрагментация ДНК, *FSHR*, G919A, A2039G, фертильность

UDC 577.21:577.218

ANALYSIS OF THE POLYMORPHIC VARIANTS G919A AND A2039G OF THE GENE *FSHR* IN MEN WITH LOW FERTILITY FUNCTION IN EASTERN UKRAINIAN POPULATION

Zhylkova I., Feskov O., Fedota O., Blazhko O.

Abstract. DNA fragmentation is defined as diminished or essential absence of chromatin compaction in nuclei of spermatozoa, and has for years been under investigation as a possible cause of reduced male fertility. Sperm maturation failures can cause DNA breaks during spermatogenesis, which are apparent in ejaculated sperm. Controlling gene mutations for stages of spermatogenesis can, therefore, lead to minor abnormalities in semen motility/morphology and function to complete absence of cells in seminiferous tubules (Sertoli cell only syndrome). Almost 150 polymorphic variants of the *FSHR* gene are currently under investigation in men and women. Polymorphisms of the *FSHR* gene have been associated with increases of FSH, decreases of progesterone and with decreasing sperm concentrations in semen. Effects of single nucleotide polymorphisms (SNP) have also been investigated. Specifically, variants G919A and A2039G, located in exon 10 of the *FSHR* gene, have been studied in regard to regulation of spermatogenesis, ovarian follicle development and estrogen synthesis.

Reported results have been contradictory: Some studies did not observe significant differences of FSH level in serum of normal and infertile patients, reaching the conclusion that SNP distribution does not matter for male reproductive function. Other investigations, however, found significant variations of SNP distributions, and suggested that ethnic differences could be involved in polymorphism-related infertility. In some previous studies, the G-29-A919-A2039 haplotype was shown to be more prevalent in normozoospermic men than in azoospermic patients (38.4% vs. 33.9%, respectively; χ^2 test, $P=0.045$), indicating that this haplotype may be a protective factor against male sterility. Quantitatively measurable parameters in reference to genetic abnormalities have, however, so far only sparsely investigated. We previously reported that in men over age 35 sperm fragmentation appears increased.

Based on the criteria set by the European Association of Urologists, suggesting that to be normally fertile, no more than 20% of the ejaculate should demonstrate damaged DNA, we investigated the DNA damage's associations with specific polymorphisms in the *FSHR* gene among male patients with reduced fertility. To avoid previously noted suspicions that ethnic backgrounds may affect these associations, we performed this study in a genetically homogenous population of Caucasian Ukrainians. Furthermore, in order to eliminate reported age-dependent associations, we concentrated on a younger patient subgroup under age 35 years.

The dependence between the level of the sperm DNA fragmentation and the genetic polymorphisms in *FSHR* gene G919A, A2039G in men is analyzed. The risk of the high level of the sperm DNA fragmentation increases in 16 times for heterozygotes GA for polymorphic variant G919A, for homozygotes AA – in 28 times; and in 16 times for heterozygotes GG for polymorphic variant A2039G comparing with the homozygotes with basic allele. The carrying of genetic polymorphism G919A, A2039G in *FSHR* gene is a risk factor of high sperm DNA fragmentation level (>20%) in men younger 35 years old with fertility failures.

Keywords: DNA fragmentation, *FSHR*, G919A, A2039G, fertility

Рецензент – проф. Кочина М. Л.

Стаття надійшла 25.09.2015 р.