

Н.Г. Горovenko^{1,3}, З.І. Россоха^{1,2}, С.П. Кир'яченко^{1,2}, Л.П. Шейко^{1,3}, Л.І. Брішевац^{1,3}

¹ДУ «Інститут генетичної та регенеративної медицини НАМН України», Київ

²ДЗ «Референс-центр з молекулярної діагностики Міністерства охорони здоров'я України», Київ

³Національна медична академія післядипломної освіти імені П.Л. Шупика, Київ

Особливості міжгенної та ген-факторної взаємодії у чоловіків із подружніх пар з безпліддям та репродуктивними втратами

Проаналізовано міжгенну та ген-факторну взаємодію поліморфних варіантів генів гемостазу (*ITGA2a* (C807T), *ITGB3b* (T1565C), *FGB* (C148T, G-455A), *PAI-1* (-675 5G/4G), *FII* (G20210A), *FV* (G1691A)), фолатного обміну (*MTHFR* (C677T, A1298C), *MTRR* (A66G), *MTR1* (A2756G), *RFC1* (G80A)) та гена рецептора фолікулоstimулюючого гормону (*FSHR*) (*Ala307Thr*, *Ser680Asn*) у 206 чоловіків із подружніх пар з безпліддям нествановленого генезу та ранніми репродуктивними втратами. Проведено порівняння отриманих результатів із застосуванням методів одно- та багатофакторного аналізу. Доведено наявність асоціації генів *ITGB3b*, *ITGA2a*, *RFC1*, *FSHR* та їх комбінацій із ризиком розвитку безпліддя у чоловіків. Значущими були п'ять прогностичних моделей ризику: міжгенної взаємодії (*PAI-1* + *ITGB3b* + *ITGA2a*, *MTHFR* + *MTR1* + *RFC1*) та ген-факторної взаємодії (*ITGB3b* + протромбіновий час, *MTHFR* + *MTR1* + *RFC1* + тютюнопаління, *FSHR* + *MTRR* + обтяжена спадковість). Виявлені залежності свідчать про різноманітність індивідуальних патогенетичних механізмів розвитку безпліддя у чоловіків, що потребує застосування персоналізованого лікування.

Ключові слова: генетичний поліморфізм, репродуктивні розлади, чоловіки.

Вступ

Безпліддя у подружніх парах в останні десятиліття сягає 10–15%, при цьому чоловічий фактор реєструють майже у половині випадків (Massart A. et al., 2012; Abarikwu S.O., 2013; Kliesch S., 2014; Agarwal A. et al., 2015; Jungwirth A. et al., 2015). Незважаючи на високу частоту виявлення ролі чоловічого фактора в безпліддних подружніх парах, залишаються невідомими провідні генетичні порушення, що спричиняють зниження репродуктивної функції у чоловіків. До останнього часу серед тестів, які використовували для визначення генетичних факторів чоловічого безпліддя (ЧБ) у клінічній практиці, основними були дослідження, спрямовані на виявлення наявності мікрodelецій Y-хромосоми та/чи хромосомних аномалій, мутацій у гені муковісцидозу та андрогенового рецептора (Wosnitzer M.S., 2014). В окремих роботах показано наявність асоціації одноступенчатого поліморфізму одного чи декількох генів із ЧБ та висловлено думку про його полігенну основу (Zorrilla M., Yatsenko A.N., 2013). Проте результати, отримані одними дослідниками, не завжди відтворювалися іншими при аналізі різних популяційних вибірок, і саме ця неоднозначність уповільнювала використання даних подібних досліджень у клінічній практиці. В експериментальних роботах із залученням тваринних моделей із нокаутами генами підтверджено полігенну основу порушень сперматогенезу та встановлено, що у механізми розвитку безпліддя залучено не менше ніж 388 генів (Massart A. et al., 2012). Процес сперматогенезу та дозрівання сперми контролюється взаємодією понад тисячі генів, але проведені повногеномні дослідження не визначили генів, асоційованих із безпліддям нествановленого генезу, тому що лише у невеликій кількості випадків виявлено одні й ті самі генетичні аномалії (Taneja S.S., 2014). У цих роботах відсутній поглиблений аналіз міжгенних та ген-факторних взаємодій з урахуванням різноспрямованих потенційних патогенетичних ланок при репродуктивних розладах, що зумовило мету виконання цієї роботи.

Мета — проведення у чоловіків із подружніх пар із безпліддям нествановленого генезу та ранніми репродуктивними втратами аналізу міжгенної та ген-факторної взаємодії поліморфних варіантів генів гемостазу (тромбоцитарного рецептора до колагену (*ITGA2a*) (C807T), тромбоцитарного рецептора фібриногену (*ITGB3b*) (T1565C), фібриногену (*FGB*) (C148T, G-455A), антагоніста тканинного активатора плазміногена 1-го типу (*PAI-1*) (-675 5G/4G), протромбіну (*FII*) (G20210A), фактора V (*FV*) (G1691A)), фолатного обміну (метилентетрагідрофолатредукта-

зи (*MTHFR*) (C677T, A1298C), метіонінсинтази-редуктази (*MTRR*) (A66G), метіонінсинтази (*MTR1*) (A2756G), транспортера фолатів (*RFC1*) (G80A)) та гена рецептора фолікулоstimулюючого гормону (*FSHR*) (*Ala307Thr*, *Ser680Asn*).

Об'єкт і методи дослідження

До дослідження залучено 206 чоловіків: 69 — із подружніх пар із безпліддям нествановленого генезу впродовж 5 років (1-ша група) та 137 — із подружніх пар із ранніми репродуктивними втратами в анамнезі (2-га група). Подружні пари направлено на медико-генетичне консультування для аналізу ймовірних та виявлення провідних генетичних чинників у розвитку безпліддя.

Критерії виключення з дослідження: аномалії каріотипу, ожиріння, соматична й онкологічна патологія, гострі та хронічні інфекційні захворювання у подружній парі, азооспермія та наявність делецій Y-хромосоми у чоловіків.

Усі пацієнти надали результати проведених до звернення на медико-генетичне консультування клініко-лабораторних та інструментальних досліджень і заповнили опитувальний лист, у який вносилися дані про спосіб життя, професійні шкідливості та шкідливі звички. Усі пацієнти надали інформовану згоду на участь у дослідженні. На проведення дослідження отримано дозвіл етичного комітету Державної установи «Інститут генетичної та регенеративної медицини НАМН України».

Молекулярно-генетичне дослідження поліморфних варіантів генів системи згортання крові (*FII* — G20210A (rs1799963), *FV* — G1691A Leiden (rs6025), *FGB* — C148T (rs1800787) та G-455A (rs1800790), *ITGB3b* — T1565C (rs5918), *ITGA2a* — C807T (rs1126643), *PAI-1* — -675 5G/4G (rs1799889)), фолатного обміну (*MTHFR* — C677T (rs1801133), A1298C (rs1801131), *MTR1* — A2756G (rs1805087), *MTRR* — A66G (rs1801394), *RFC1* — G80A (rs1051266)), гена *FSHR* (*Ala307Thr* (rs6165), *Ser680Asn* (rs6166)) проводили методами алельспецифічної полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР) або ПЛР з подальшим аналізом поліморфізму довжини рестрикційних фрагментів.

Статистичний аналіз результатів проводили з використанням програмного пакета «MS Excel» та програми «SPSS 17.0». Достовірність відмінностей визначали із застосуванням критерію χ^2 з поправкою Йетса при рівні значущості $p < 0,05$ (після корекції отриманих результатів з урахуванням множинних порівнянь). Асоціацію поліморфних варіантів генів та їх комбінацій з ризиком розвитку ЧБ досліджували за допомогою розрахунку відношення

шансів (ВШ) з 95% довірчим інтервалом (ДІ). Головні незалежні, а також спільні ефекти всіх проаналізованих генів, визначали з використанням статистичної програми мультифакторної просторової редукції (MDR) та пермутаційного тесту (MDR.pt).

Результати та їх обговорення

У пацієнтів обох груп проаналізовано та порівняно результати 32 клініко-лабораторних показників, включаючи показники фолатного обміну і гемостазу, та особливості способу життя з опитувального листа у поєднанні з генетичним поліморфізмом (сімнадцятьма поліморфними варіантами) досліджених генів. За дослідженими клініко-лабораторними показниками достовірних відмінностей, окрім показників фолатного обміну, не виявлено. Відповідно до критеріїв європейських консенсусів та настанов (Stanger O. et al., 2003; Devalia V. et al., 2014; Wilcken B., 2017) гіпергомоцистеїнемію (ГГЦ), яку реєструють при рівні гомотеїну >12 мкмоль/л, виявлено у пацієнтів обох груп. Середній рівень гомотеїну у пацієнтів 2-ї групи був значуще вищий порівняно з пацієнтами 1-ї групи ($p<0,05$), відповідно значуще різнилися показники рівня вітаміну B_{12} ($p<0,05$). ГГЦ виявлено у 34,78% пацієнтів 1-ї та 37,96% — 2-ї групи. Пацієнти обох груп мали обтяжений (випадками кардіоваскулярних та онкологічних захворювань і репродуктивних розладів) родовід (табл. 1).

Таблиця 1. Базова клініко-лабораторна характеристика пацієнтів

Клініко-лабораторні показники	Група	
	1-ша	2-га
Антропометричні		
Вік, років	35,23±0,62	34,52±0,51
Зріст, см	177,4±1,73	174,49±2,06
Маса тіла, кг	81,9±3,71	79,45±1,49
Порушення сперматогенезу, %		
Олігоспермія	43,48	38,69
Астенозооспермія	14,49	21,17
Нормозоспермія	13,14	13,14
Середній рівень концентрації в плазмі крові (M±m)		
Гомотеїн, мкмоль/л	12,01±0,92	18,16±1,80
Фолієва кислота, нг/мл	11,18±1,25	8,56±0,68
Вітамін B_{12} , пг/мл	500,71±51,10	316,55±28,61
Показники коагулограми		
Протромбіновий індекс, %	93,40±4,23	97,01±6,29
Протромбіновий час, с	12,05±0,34	11,5±0,24
Активований частковий тромбoplastинний час, с	31,06±1,83	28,44±0,65
Тромбіновий час, с	18,84±0,52	18,23±0,45
Фібриноген, г/л	2,59±0,14	2,54±0,11
Фактори ризику, %		
Тютюнопаління	17,39	24,09
Обтяжена спадковість, %		
Онкологічні захворювання	7,25	12,41
Кардіоваскулярні захворювання	27,54	28,47
Репродуктивні розлади	4,35	9,48
Інше	8,70	14,60

У 14,49% пацієнтів 1-ї групи достовірно частіше виявляли генотип 1565CC за геном *ITGB3b* порівняно з 1,46% пацієнтів 2-ї групи ($\chi^2=11,9$, $p=0,001$; ВШ 11,44; 95% ДІ 2,43–53,8). У 1-ї групі також спостерігали підвищення частоти генотипу 807TT за геном *ITGA2a* — 27,54% порівняно з 10,21% у 2-ї групі ($\chi^2=8,98$, $p=0,003$; ВШ 3,34; 95% ДІ 1,55–7,17). В осіб із генотипом 807CC за геном *ITGA2a* виявлено зниження ризику безпліддя ($\chi^2=4,41$, $p=0,036$; ВШ 0,49; 95% ДІ 0,27–0,92). Отже, гени *ITGB3b* та *ITGA2a* асоційовані з розвитком ЧБ.

При аналізі впливу генів системи гемостазу на розвиток ЧБ з використанням методу MDR отримано 7 моделей міжгенної взаємодії. Значущими були 3-, 4- та 5-локусна моделі (табл. 2).

Таблиця 2. Прогностичні моделі міжгенних взаємодій у розвитку ЧБ

Кількість локусів	Ген/комбінації генів у моделі	Точність моделі, %	Відтвореність моделі
1	<i>ITGA2a</i> C807T	51,34	9/10
2	<i>FGB</i> C148T/ <i>ITGA2a</i>	56,04	5/10
3	<i>PAI-1</i> , <i>ITGB3b</i> , <i>ITGA2a</i>	65,86	10/10
4	<i>FGB</i> C148T/ <i>PAI-1</i> , <i>ITGB3b</i> , <i>ITGA2a</i>	64,77	10/10
5	<i>FGB</i> C148T/ <i>PAI-1</i> , <i>ITGB3b</i> , <i>FV</i> , <i>ITGA2a</i>	62,58	8/10
6	<i>FGB</i> C148T/ <i>PAI-1</i> , <i>ITGB3b</i> , <i>FII</i> , <i>FV</i> , <i>ITGA2a</i>	60,02	8/10
7	<i>FGB</i> C148T/ <i>PAI-1</i> , <i>ITGB3b</i> , <i>FII</i> , <i>FV</i> , <i>ITGA2a</i>	60,02	10/10

Достовірність моделі за пермутаційним тестом: * $p<0,05$, ** $p<0,01$.

Прогностична цінність була найкращою у 3-локусній моделі: (*PAI-1*, *ITGB3b*, *ITGA2a*), тому дослідники вважали за необхідне проаналізувати виявлений взаємозв'язок. Для генів, що становили основу значущих прогностичних моделей, підраховано зв'язок з іншими генами гемостазу у розвитку безпліддя, а також проаналізовано поєднаний вплив комбінацій генотипів (табл. 3).

Таблиця 3. Значущі комбінації генотипів за поліморфними варіантами генів *ITGB3b*, *ITGA2a*, *FGB*, *PAI-1*, *FV*, асоційовані з ризиком ЧБ

Генотип	Група, n/%		χ^2	ВШ	95% ДІ	p
	1-ша	2-га				
<i>ITGB3b</i> T1565C/<i>ITGA2a</i> C807T						
1565CC/807TT	7/10,14	0/0,00	11,5	—	—	0,001
<i>ITGB3b</i> T1565C/<i>FGB</i> C148T						
1565CC/148CC	5/7,25	2/1,46	4,68	5,27	1,00-27,92	0,031
1565CC/148CT	5/7,25	0/0,00	7,34	—	—	0,007
1565TT/148TT	4/5,80	0/0,00	5,34	—	—	0,021
<i>ITGB3b</i> T1565C/<i>FGB</i> G-455A						
1565CC/-455GG	6/8,69	2/1,46	4,64	6,43	1,26-32,8	0,031
1565CC/-455GA	4/5,80	0/0,00	5,34	—	—	0,021
<i>ITGA2a</i> C807T/<i>FGB</i> C148T						
807CT/148CC	11/15,94	40/29,20	4,33	0,46	0,22-0,97	0,038
807TT/148CC	14/20,29	11/8,03	5,37	2,92	1,25-6,83	0,020
<i>ITGA2a</i> C807T/<i>FGB</i> G-455A						
807CC/-455GA	6/8,69	31/22,63	5,14	0,33	0,13-0,82	0,023
807CT/-455GG	11/15,94	40/29,19	3,98	0,46	0,22-0,97	0,047
807TT/-455GG	15/21,73	11/8,03	6,63	3,18	1,37-7,38	0,010
<i>FGB</i> C148T/<i>FGB</i> G-455A						
148TT/455AA	5/7,25	2/1,46	4,68	5,27	1,00-27,92	0,031
<i>PAI-1</i> -675 5G/4G/<i>FV</i> G1691A						
4G4G/1691GA	4/5,80	0/0,00	5,34	—	—	0,021

Як видно (див. табл. 3), у пацієнтів з генотипом 1565CC за геном *ITGB3b* у поєднанні з генотипами 148CC, 148CT та -455GG, -455GA за геном *FGB* — підвищений ризик безпліддя. У пацієнтів 2-ї групи взагалі не виявлено комбінацій генотипу 1565CC з гетерозиготними варіантами гена *FGB*. У жодного пацієнта обох груп не виявлено комбінацій генотипів 1565CC/148TT, 1565CC/-455AA за генами *ITGB3b* та *FGB*.

Виявлено підвищену частоту комбінації генотипів 1565TT/148TT за генами *ITGB3b* та *FGB* у пацієнтів 1-ї групи порівняно з 2-ю (причому у 2-й групі таких пацієнтів не виявлено) та генотипів 148TT/-455AA за геном *FGB*. Частота комбінації генотипів 1565CC/807TT за генами *ITGB3b* та *ITGA2a* також була підвищена у пацієнтів 1-ї групи, а у 2-й таких пацієнтів не виявлено.

Комбінації генотипів 807CT/-455GG, 807CT/148CC, 807CC/-455GA, 807CC/148CT за генами *ITGA2a* та *FGB* були значуще підвищеними у 2-й групі, тобто знижували ризик безпліддя. У пацієнтів 1-ї групи була достовірно підвищена частота комбінації генотипів 4G4G/1691GA за генами *PAI-1* та *FV*. Отже, комбінації за генами, асоційованими з порушеннями гемостазу, мають важливе значення для розвитку ЧБ.

При аналізі впливу комбінації факторів (ген-факторних взаємодій) з урахуванням генів системи гемостазу на зростання ризику безпліддя виявили значущий вплив у прогностичній моделі: протромбіновий час та варіант гена *ITGB3b* (константа -4,995): 1565TC (коефіцієнт регресії 0,352; стандартна похибка 0,143; $p=0,013$; ВШ 1,42) та 1565CC (коефіцієнт регресії 0,288; стандартна похибка 0,130; $p=0,026$; ВШ 1,33).

Протромбіновий час — інтегративний показник, який характеризує зовнішній шлях згортання крові; при його зниженні підвищується ризик тромботичних подій. Найважливіша особливість фізіологічних процесів при активації тромбоцитів — модифікація комплексу мембранних глікопротеїдів IIb-IIIa. У результаті конформаційних змін комплекс набуває здатності до зв'язування фібриногену. Внаслідок відбувається агрегація, яка закінчується формуванням в ділянці пошкодження судинної стінки тромбоцитарного тромбу. Рецептор GPIIb/IIIa є основним тромбоцитарним рецептором, молекулярні дефекти якого можуть призводити до гіперагрегації тромбоцитів. Комплекс складається із двох субодиниць IIb і IIIa, які кодуються генами, розміщеними близько один до одного на 17-й хромосомі. *ITGB3* (GPIIb) кодує білковий компонент тромбоцитарного рецептора фібриногену. Цей рецептор забезпечує взаємодію тромбоцитів із фібриногеном, в результаті чого відбувається агрегація тромбоцитів і утворення тромбу. Точкова мутація *C1565T* у другому екзоні гена *ITGB3b* призводить до заміни лейцину (Leu) на пролін (Pro) в 33-му положенні білка

GP1IIa (rs5918). Тромбоцити, що несуть *ITGB3*-Pro33, мають нижчий поріг активації (більш схильні до агрегації), і при варіанті 1565C ризик тромботичних подій підвищений (Kucharska-Newton A.M. et al., 2011; Зотова Т.Ю., Мяндин Г.И., 2013). Тому, ймовірно, наявність варіантів гена *ITGB3b* у комбінації зі зниженим протромбінним часом супроводжується згущенням крові в мікроциркуляторному руслі та погіршенням адгезивних властивостей клітин.

Різні порушення фолатного обміну і транспорту фолатів, внаслідок чого виникають як ГГЦ, так і гіпофолатемія чи гіперфолатемія, раніше досліджені нами як чинники розвитку тромбофілічних розладів, жіночого безпліддя та несприятливого перебігу антенатального періоду і погіршеного здоров'я нащадків (Горовенко Н.Г. и соавт., 2011; Rossokha Z., Gorovenko N., 2017).

У напрямку дослідження чоловічого здоров'я подібних робіт було обмаль (Жилкова Е.С., 2017), хоча в експериментальних роботах на тваринах неодноразово доведена важливість фолатного обміну для репродуктивної функції (Hong H.H. et al., 2017).

При проведенні порівняльного аналізу одержаних нами результатів молекулярно-генетичних досліджень встановлено, що у чоловіків 1-ї групи достовірно частіше виявляли генотип 80AA за геном *RFC1* ($\chi^2=3,94$, $p=0,048$; ВШ 1,90; 95% ДІ 1,00–3,61). За результатами проведених порівнянь комбінацій генотипів у групах виявлено асоціацію поєднання генотипу 80AA за геном *RFC1* з гомозиготними варіантами 2756AA за геном *MTR1* ($\chi^2=3,96$, $p=0,047$; ВШ 2,24; 95% ДІ 1,00–5,01), 677CC за геном *MTHFR* ($\chi^2=4,45$, $p=0,035$; ВШ 3,06; 95% ДІ 1,17–8,00) та розвитком безпліддя.

Поліморфізм G80A гена *RFC1* є одним із варіантів генів транспортерів фолатів, що модифікують вплив відомих та досліджених варіантів генів *MTHFR*, *MTR1* (Bueno O. et al., 2016), у тому числі різноспрямовано, що підтверджено й нашими результатами. Встановлено, що поєднання генотипу 80AA за геном *RFC1* із функціональними генотипами за генами *MTHFR*, *MTR1* підвищувало ризик безпліддя.

Функціональна роль *RFC1* полягає у зв'язуванні та поглинанні фолату, регуляції його внутрішньоклітинного транспорту, цей процес залежить від рівня фолієвої кислоти у сироватці крові та наявності чи відсутності додаткового споживання фолієвої кислоти. Із експериментальних робіт та окремих досліджень відомо, що в осіб з наявним алелем 80A за геном *RFC1* погіршений внутрішньоклітинний транспорт фолатів (Gelineau-van Waes J. et al., 2008; Pietrzik K. et al., 2010; Visentin M. et al., 2014), який, ймовірно, більш важливий для репродуктивної функції, аніж метаболічні перетворення фолієвої кислоти за участю *MTHFR* та *MTR1*.

При порівнянні груп встановлено значущу 5-локусну прогностичну модель ризику, предиктивна цінність якої була 59,26% (рисунк).

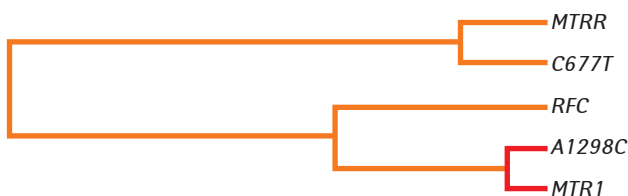


Рисунок. Дендрограма міжгенної взаємодії *MTHFR*, *MTRR*, *MTR1*, *RFC1* у розвитку ЧБ

Поєднання нефункціональних генотипів за генами фолатного обміну частіше виявляли у пацієнтів 1-ї групи. У 4,35% пацієнтів 1-ї групи виявлено комбінацію генотипів 2756GG/1298CC за генами *MTR1*, *MTHFR*, в той час як у пацієнтів 2-ї групи такого поєднання генотипів взагалі не виявлено ($\chi^2=6,05$; $p=0,014$). Комбінація генотипів 2756AA/677CC за генами *MTR1* та *MTHFR* була знижена у пацієнтів 1-ї групи порівняно з 2-ю ($\chi^2=4,04$, $p=0,045$; ВШ 0,49; 95% ДІ 0,24–0,99).

Виразений модифікуючий вплив на ризик безпліддя (табл. 4) виявлено для генотипу 80AA за геном *RFC1* у поєднанні із генотипом 807TT за геном *ITGA2a* та генотипом 1565CC за геном *ITGB3b* (у 2-й групі взагалі не було пацієнтів із такою комбінацією генотипів). Також достовірно частіше у 1-й групі виявлена комбінація генотипів 80AA/148CC за генами *FGF* та *RFC1*.

Таблиця 4. Значущі комбінації генотипів за генами *RFC1*, *ITGA2a*, *ITGB3b*, *FGF*, *MTRR*, *MTR1*, *FSHR*, асоційовані з ризиком ЧБ

Комбінація генотипів	Група		Результати статистичного аналізу					
	1-ша	2-га						
	n	%	n	%	χ^2	ВШ	95% ДІ	p
<i>RFC1</i> G80A/<i>ITGB3b</i> C148T								
80AA/148CC	14	20,3	12	8,76	4,54	2,65	1,15–6,10	0,033
<i>RFC1</i> G80A/<i>ITGA2a</i> C807T								
80AA/807TT	6	8,70	1	0,73	6,61	12,9	1,53–109,8	0,010
<i>RFC1</i> G80A/<i>FSHR</i> T1565C								
80AA/1565CC	3	4,34	0	0,00	6,05	–	–	0,014
<i>RFC1</i> G80A/<i>FSHR</i> Ala307Thr								
80GA/307Thr/Thr	6	8,70	28	20,44	4,59	0,37	0,15–0,94	0,033
<i>FSHR</i> Ala307Thr/<i>FGF</i> G-455A								
307Ala/Thr/–455GA	10	14,5	8	5,84	3,95	2,73	1,04–6,78	0,041
<i>FSHR</i> Ala307Thr/<i>MTRR</i> A66G								
307Ala/Ala/66AG	9	13,1	6	4,38	5,10	3,28	1,12–9,62	0,024
<i>FSHR</i> Ala307Thr/<i>MTR1</i> A2756G								
307Ala/Ala/2756AA	11	15,9	8	5,84	4,45	3,06	1,17–8,00	0,035

Частота генотипів 307Ala/Ala та 680Ser/Ser за геном *FSHR* достовірно частіше переважала в 1-й групі (26,09%) порівняно з 2-ю (14,60%) ($\chi^2=4,03$, $p=0,045$; ВШ 2,06; 95% ДІ 1,01–4,23), для варіантів гена *FSHR* в українській популяції доведена асоціація зі ступенем фрагментації ДНК (>20%) у сперматозоїдах у чоловіків віком <35 років, а також асоціація поліморфних генів фолатного обміну з рівнем анеуплоїдії сперми (Жилкова Е.С., 2017). У виконаному нами дослідженні наявність генотипу 80GA за геном *RFC1* в поєднанні з генотипом 307Thr/Thr за геном *FSHR* знижувала ризик розвитку безпліддя (див. табл. 4). Останній був підвищеним за наявності комбінації генотипу 307Ala/Ala за геном *FSHR* з генотипами 66AG за геном *MTRR* та 2756AA — за геном *MTR1*.

Методом бінарної логістичної регресії отримано дві значущі прогностичні моделі, які ґрунтувалися на міжгенній та ген-факторній взаємодії генів фолатного обміну та гена *FSHR* (табл. 5).

Таблиця 5. Значущі прогностичні моделі міжгенної та ген-факторної взаємодії у розвитку безпліддя

Показник	Коефіцієнт регресії	Стандартна помилка	Значущість відмінностей	ВШ	95% ДІ
1298AC/677CT/2756AG/80AA	1,744	0,845	0,039	5,719	1,091–29,972
Константа	–0,645	0,218	0,003	0,525	–
1298AC/677CT/2756AG/80AA/тютюнопаління	1,803	0,837	0,031	6,089	1,176–31,300
Константа	–0,704	0,184	0,000	0,494	–
307Ala/Thr/66GG/обтяжена спадковість	1,292	0,650	0,047	3,640	1,018–13,013
Константа	–0,732	0,172	0,000	0,481	–

Комбінація гетерозиготного варіанта гена *FSHR* з мутантним генотипом *MTR1* та обтяженою спадковістю була серед достовірних прогностичних моделей ризику безпліддя. У пацієнтів із гетерозиготними варіантами спадковість була обтяжена серцево-судинними та онкологічними захворюваннями, тромботичними станами і репродуктивними розладами у родичів 1-го та 2-го ступеня спорідненості. Більшу прогностичну цінність мали моделі, побудовані на аналізі взаємодій генів фолатного обміну. Наявність у пацієнтів комбінацій гетерозиготних варіантів за генами *MTHFR*, *MTR1* та генотипу 80AA за геном *RFC1* підвищувала ризик безпліддя у 5,7 раза, а за наявності тютюнопаління цей ризик зростав у >6 разів. Отже, тютюнопаління призводило до підвищення ризику безпліддя у пацієнтів із варіантами генів фолатного обміну, за яких знижена функціональна активність ензимів, а у разі *MTR1*, навпаки, — підвищена. Виявлення серед чоловіків репродуктивного віку — курців поліморфних варіантів генів фолатного обміну вкрай необхідне для персоналізованого призначення вітамінно-нутриєнтних препаратів. Для цих чоловіків без персоналізованого підходу у призначенні вітамінів групи В та фолієвої кислоти суттєво підвищується ризик не лише зниження репродуктивної функції, а й розвитку фатальних серцево-судинних подій. Опосередкована ознака цього ризику — висока частота виявлення серед пацієнтів обох груп ГГЦ, зумовленої мутаціями у генах фолатного обміну (аутосомно-рецесивного спадкового метаболічного захворювання, за останньою редакцією Міжнародної класифікації хвороб 10-го перегляду).

У пацієнтів обох груп були підвищеними показники середньо-го рівня гомоцистеїну ($12,01 \pm 0,92$ та $18,16 \pm 1,80$), які, окрім цього, значуще розрізнялися між собою. Виявлена ГГЦ, спричинена поліморфізмом генів фолатного обміну, у більше ніж $\frac{1}{3}$ чоловіків обох груп є важливим патогенетичним чинником у розвитку безпліддя нестановленого генезу та ранніх репродуктивних втрат у подружніх парах. Пацієнти з ГГЦ, спадковим метаболічним захворюванням, потребують медичних втручань, а саме персоналізованого призначення вітамінно-нутриєнтних препаратів для запобігання безпліддю та раннім репродуктивним втратам і серцево-судинним захворюванням.

Висновки

1. Виявлено асоціацію генів *ITGB3b*, *ITGA2a* та їх комбінацій зі зростанням ризику безпліддя. Значущими у розвитку ЧБ були 3-локусна прогностична модель міжгенної взаємодії (*PAI-1 + ITGB3b + ITGA2a*) та 2-локусна прогностична модель ген-факторної взаємодії (*ITGB3b* + показник протромбінового часу).
2. Встановлено асоціації генотипу 80AA за геном *RFC1* у поєднанні з генами фолатного обміну та гемостазу зі зростанням ризику безпліддя. Значущими були 4-локусна модель міжгенної взаємодії та модель ген-факторних взаємодій, побудована на варіантах гена *MTHFR*, *MTRR*, *RFC1* і тютюнопаління.
3. Встановлено асоціацію алельних варіантів 307Ala/Ala і 680Ser/Ser гена *FSHR* та їх комбінацій із варіантами генів фолатного обміну з розвитком безпліддя, а значуще прогностичною була модель ген-факторних взаємодій, яка включала варіанти генів *FSHR*, *MTRR* та обтяжену спадковість.
4. Аналіз асоціації саме певних поліморфних варіантів генів різних метаболічних ланок між собою та у поєднанні з негенетичними факторами дозволяє говорити про значну гетерогенність ЧБ і необхідність формування персоналізованого підходу в лікуванні.

Список використаної літератури

- Горovenko Н.Г., Кирьяченко С.П., Россоха З.И. (2011) Изучение ассоциации полиморфных вариантов генов *ACE (I/D)*, *AT2R1 (A1166C)*, *TNF-α (G308A)*, *MTHFR (C677T)* и их комбинаций с риском развития перинатальной патологии и сокращением сроков гестации. *Вісник мед. наук*, 27(3): 206–213.
- Жилкова Е.С. (2017) Генетичні аспекти репродуктивної функції у чоловіків у східній Україні. автореф. ... канд. біол. наук. Київ, 25 с.
- Зотова Т.Ю., Мяндин Г.И. (2013) Влияние полиморфизма гена *ITGB3* на частоту развития артериальной гипертензии у больных с острым коронарным синдромом. *Клин. мед.*, 8: 22–27.
- Abarikwu S.O. (2013) Causes and risk factors for male-factor infertility in Nigeria: a review. *Afr. J. Reprod. Health*, 17(4): 150–166.
- Agarwal A., Mulgund A., Hamada A., Chyatte M.R. (2015) A unique view on male infertility around the globe. *Reprod. Biol. Endocrinol.*, 13: 37.
- Bueno O., Molloy A.M., Fernandez-Ballart J.D. et al. (2016) Common Polymorphisms That Affect Folate Transport or Metabolism Modify the Effect of the *MTHFR* 677C>T Polymorphism on Folate Status. *J. Nutr.*, 146(1): 1–8.
- Devalia V., Hamilton M.S., Molloy A.M.; British Committee for Standards in Haematology (2014) Guidelines for the diagnosis and treatment of cobalamin and folate disorders. *Br. J. Haematol.*, 166(4): 496–513.
- Gelineau-van Waes J., Maddox J.R., Smith L.M. et al. (2008) Microarray analysis of E9.5 reduced folate carrier (*RFC1*; *Slc19a1*) knockout embryos reveals altered expression of genes in the cubilin-megalin multiligand endocytic receptor complex. *BMC Genomics*, 9: 156.
- Hong H.H., Hu Y., Yu X.Q. et al. (2017) Associations of C677T polymorphism in methylenetetrahydrofolate reductase (*MTHFR*) gene with male infertility risk: A meta-analysis. *Eur. J. Obstet. Gynecol. Reprod. Biol.*, 212: 101–109.
- Jungwirth A., Diemer T., Dohle G.R. et al. (2015) Guidelines on Male Infertility (https://uroweb.org/wp-content/uploads/17-Male-Infertility_LR1.pdf).
- Kliesch S. (2014) Diagnosis of Male Infertility: Diagnostic Work-up of the Infertile Man. *Eur. Urol.*, 13: 73–82.
- Kucharska-Newton A.M., Monda K.L., Campbell S. et al. (2011) Association of the platelet GPIIb/IIIa polymorphism with atherosclerotic plaque morphology: the Atherosclerosis Risk in Communities (ARIC) Study. *Atherosclerosis*, 216(1): 151–156.
- Massart A., Lissens W., Tournaye H., Stouffs K. (2012) Genetic causes of spermatogenic failure. *Asian J. Androl.*, 14(1): 40–48.
- Pietrzik K., Bailey L., Shane B. (2010) Folic acid and L-5-methyltetrahydrofolate: comparison of clinical pharmacokinetics and pharmacodynamics. *Clin. Pharmacokinet.*, 49(8): 535–548.
- Rossokha Z., Gorovenko N. (2017) Assessment of the individual folic acid doses requirement for patient with reproductive disorders. *J. Perinat. Med.*, 45(2): 349.

Stanger O., Herrmann W., Pietrzik K. et al. (2003) DACH-LIGA homocystein (german, austrian and swiss homocysteine society): consensus paper on the rational clinical use of homocysteine, folic acid and B-vitamins in cardiovascular and thrombotic diseases: guidelines and recommendations. *Clin. Chem. Lab. Med.*, 41(11): 1392–1403.

Taneja S.S. (2014) Current management of male infertility. *Urol. Clin. North Am.*, 41(1): xv.

Visentini M., Diop-Bove N., Zhao R., Goldman I.D. (2014) The intestinal absorption of folates. *Ann. Rev. Physiol.*, 76: 251–274.

Wilcken B. (2017) Therapeutic targets in homocystinuria due to cystathionine β-synthase deficiency: new European guidelines. *Exp. Opin. Orph. Drugs*, 5: 1–3.

Wosnitzer M.S. (2014) Genetic evaluation of male infertility. *Transl. Androl. Urol.*, 3(1): 17–26.

Zorrilla M., Yatsenko A.N. (2013) The Genetics of Infertility: Current Status of the Field. *Curr. Genet. Med. Rep.*, 1(4) (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3885174/>).

Особенности межгенного и ген-факторного взаимодействия у мужчин из супружеских пар с бесплодием и репродуктивными потерями

Н.Г. Горovenko, З.И. Россоха, С.П. Кирьяченко, Л.П. Шейко, Л.И. Бришевац

Резюме. Проанализировано межгенное и ген-факторное взаимодействие полиморфных вариантов генов гемостаза: *ITGA2a (C807T)*, *ITGB3b (T1565C)*, *FGB (C148T, G-455A)*, *PAI-1 (-675 5G/4G)*, *FII (G20210A)*, *FV (G1691A)*, фолатного обмена: *MTHFR (C677T, A1298C)*, *MTRR (A66G)*, *MTR1 (A2756G)*, *RFC1 (G80A)* и гена рецептора фолликулостимулирующего гормона *FSHR (Ala307Thr, Ser680Asn)* у 206 мужчин из супружеских пар с бесплодием неустовленного генеза и ранними репродуктивными потерями. Проведено сравнение полученных результатов с применением методов одно- и многофакторного анализа. Доказано наличие ассоциации генов *ITGB3b*, *ITGA2a*, *RFC1*, *FSHR* и их комбинаций с риском развития бесплодия у мужчин. Значимыми были пять прогностических моделей риска: межгенного взаимодействия (*PAI-1 + ITGB3b + ITGA2a*, *MTHFR + MTR1 + RFC1*) и ген-факторного взаимодействия (*ITGB3b* + протромбиновое время, *MTHFR + MTR1 + RFC1* + курение, *FSHR + MTRR* + отягощенная наследственность). Выявленные зависимости указывают на разнообразие индивидуальных патогенетических механизмов развития бесплодия у мужчин, что требует применения персонализированного лечения.

Ключевые слова: генетический полиморфизм, репродуктивные расстройства, мужчины.

Features of gene-gene and gene-factor interactions in men from couples with infertility and reproductive losses

N.G. Gorovenko, Z.I. Rossokha, S.P. Kiryachenko, L.P. Sheiko, L.I. Brisevac

Summary. Gene-gene and gene-factor interactions of genes polymorphic variants of hemostasis: *ITGA2a (C807T)*, *ITGB3b (T1565C)*, *FGB (C148T, G-455A)*, *PAI-1 (-675 5G/4G)*, *FII (G20210A)*, *FV (G1691A)*, of folate metabolism: *MTHFR (C677T, A1298C)*, *MTRR (A66G)*, *MTR1 (A2756G)*, *RFC1 (G80A)* and follicle-stimulating hormone receptor gene *FSHR (Ala307Thr, Ser680Asn)* has been analyzed in 206 men from couples with unexplained infertility and early reproductive losses. A comparison of obtained results conducted using the methods of single – and multivariate statistical analysis. The association of *ITGB3b*, *ITGA2a*, *RFC1*, *FSHR* genes and their combinations with the risk of infertility in men has been proven. Five prognostic risk models were significant: gene-gene interaction (*PAI-1 + ITGB3b + ITGA2a*, *MTHFR + MTR1 + RFC1*) and gene-factor interaction (*ITGB3b* + prothrombin time, *MTHFR + MTR1 + RFC1* + smoking, *FSHR + MTRR* + hereditary burden). The founded dependencies indicated a variety of individual pathogenetic mechanisms in development of men infertility that requires the use of personalized treatment.

Key words: genetic polymorphism, reproductive disorders, men.

Адреса для листування:

Россоха Зоя Іванівна
04112, Київ, вул. Дорогожицька, 9
ДЗ «Референс-центр з молекулярної діагностики МОЗ України»
E-mail: zoiroh071@gmail.com

Одержано 04.10.2018