

О.А. ФЕСАЙ¹, С.А. КРАВЧЕНКО¹,
М.Я. ТЫРКУС², Г.В. МАКУХ¹, В.М. ЗИНЧЕНКО³,
Г.В. СТРЕЛКО⁴, Л.А. ЛИВШИЦ¹

¹ Институт молекулярной биологии и генетики НАН Украины, Киев

² Институт наследственной патологии АМН Украины, Львов

³ Клиника «ИСИДА-IVF», Киев

⁴ Клиника «Виктория», Киев

СAG-ПОЛИМОРФИЗМ ГЕНА АНДРОГЕНОВОГО РЕЦЕПТОРА У МУЖЧИН С АЗОСПЕРМИЕЙ И ОЛИГОЗОСПЕРМИЕЙ ИЗ УКРАИНЫ



Анализ количества СAG-повторов в экзоне 1 гена AR проводили среди 228 мужчин с бесплодием (68 индивидов с азооспермией, 160 индивидов с олигозооспермией) и 124 фертильных мужчины, которые составили контрольную группу, при помощи полимеразной цепной реакции с последующим фрагментным анализом на автоматическом флюоресцентном анализаторе «A.L.F.-express». Частота аллелей с ≤ 18 СAG-повторами была статистически достоверно выше ($P < 0,01$) в группе пациентов с азооспермией (17,7 %) по сравнению с контрольной группой (2,4 %), так же как и в группе пациентов с олигозооспермией (12,5 %) по сравнению с контрольной группой (2,4 %). Частота аллелей с ≥ 28 СAG-повторами была статистически достоверно выше ($P < 0,01$) в группе пациентов с олигозооспермией (12,5 %) по сравнению с контрольной группой (2,4 %). Наши данные позволили предположить наличие ассоциации между количеством СAG-повторов и нарушением сперматогенеза у мужчин с азооспермией и олигозооспермией.

© О.А. ФЕСАЙ, С.А. КРАВЧЕНКО, М.Я. ТЫРКУС,
Г.В. МАКУХ, В.М. ЗИНЧЕНКО, Г.В. СТРЕЛКО,
Л.А. ЛИВШИЦ, 2009

Введение. Приблизительно 40 % случаев мужского бесплодия составляет идиопатическое бесплодие, имеющее генетическую природу. Наиболее часто встречаются такие генетические дефекты, как хромосомные аберрации, микроделеции Y-хромосомы (локусы AZFa, AZFb, AZFc), мутации и полиморфизмы генов *TRPM* (трансмембранный регуляторный белок муковисцидоза) и *AR* (андрогеновый рецептор).

Андрогены – это мужские половые гормоны стероидной природы, образующиеся в половых железах и коре надпочечников. Они стимулируют функцию мужских половых органов и развитие вторичных половых признаков [1].

Представителями андрогенов в мужском организме являются тестостерон и его метаболит дигидротестостерон (ДГТ).

Снижение концентрации андрогенов вызывает тяжелые нарушения продукции спермы [2]. Андрогены также являются важными регуляторами клеточной пролиферации в предстательной железе [3].

Рецепторы андрогенов, как и других стероидных гормонов, принадлежат к семейству внутриклеточных рецепторов. Ген рецептора андрогенов (androgen receptor, *AR*) локализован в прицентромерном районе длинного плеча X-хромосомы (Xq11–12) и состоит из восьми экзонов. Эти экзоны кодируют четыре белковых домена: домен, который активирует транскрипцию, взаимодействуя с другими ко-рецепторами (экзон 1), ДНК-связывающий домен (экзоны 2 и 3), петлевой домен, состоящий из двух элементов «цинковых пальцев» (экзон 4), и гормон-связывающий домен (экзоны 5–8) (рис. 1) [4–7].

Экспрессия гена *AR* начинается во время эмбрионального развития плода. мРНК этого гена обнаруживается уже на стадии органогенеза: в развивающихся мужских и женских гонадах, гипофизе, надпочечниках, почках, Вольфовом протоке и его производных, молочных железах, зачатках мускулов, гипоталамусе и зачатках нервной системы [8–10]. Показано, что в экзоне 1 гена *AR* находится полиморфная последовательность тринуклеотидных СAG-повторов, которая кодирует полиглутаминовый участок пептида, являющийся специфичным рецептором для тестостерона. Упомянутый гормон играет важную роль в процессе дифференцировки–редифференцировки клеток во

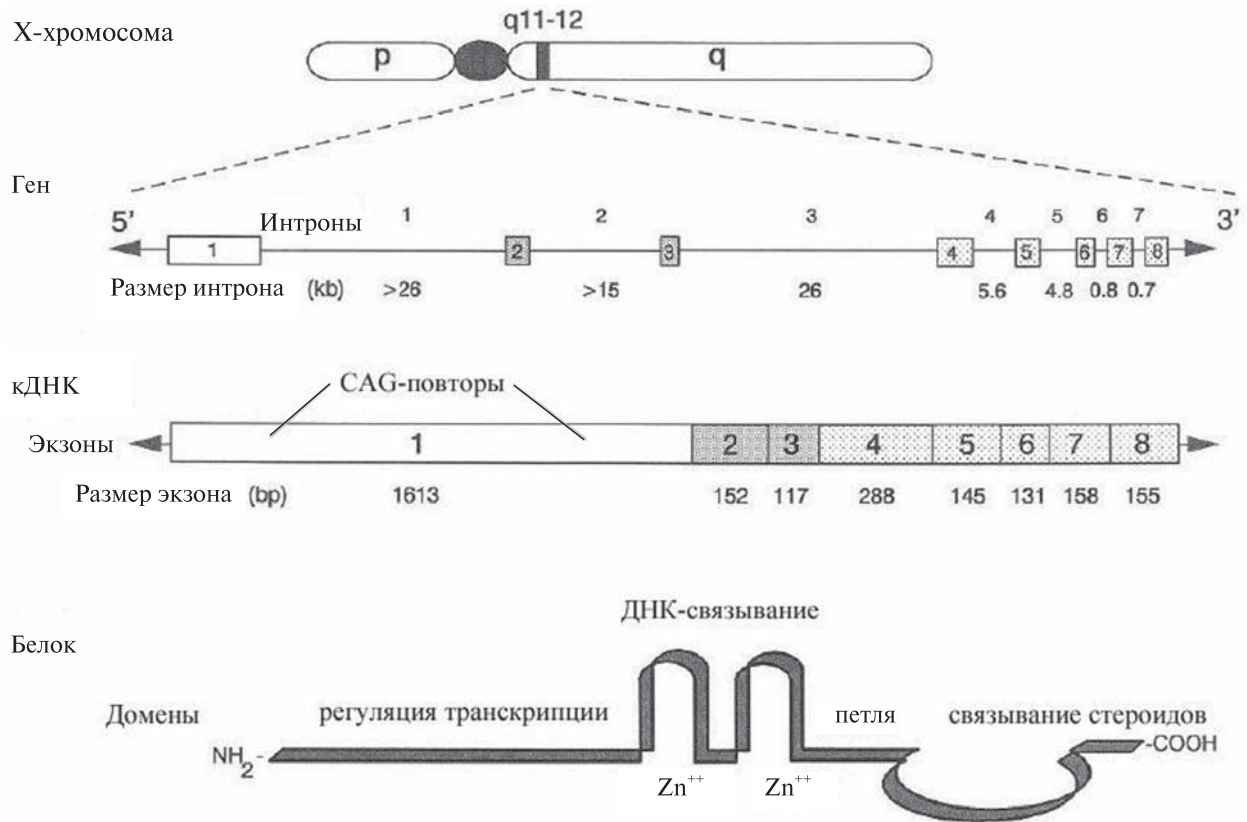


Рис. 1. Схематическое изображение хромосомной локализации и структуры гена *AR*, а также его белка



Рис. 2. Схема зависимости транскрипционной активности гена *AR* от длины CAG-повторов

время гистогенеза [11]. Как и в случае с другими генами, содержащими CAG-повторы, высокая полиморфность последовательности, кодирующей полиглутаминовый тракт гена андрогенового рецептора, объясняется «проскальзыванием» ДНК-полимеразы на данном участке в

процессе репликации ДНК. Это и приводит к вариативности конечного количества CAG-повторов [12].

В ряде исследований было показано, что меньшему числу CAG-повторов соответствовала меньшая степень конформационных изменений рецептора и, как следствие, большая степень связи в комплексе гормон–рецептор, приводящей к активации транскрипции [13], а с увеличением длины CAG-повторов транскрипционная активность гена *AR* падает [14] (рис. 2).

Поэтому логично предположить, что экспансия CAG-повторов в экзоне 1 гена *AR* приводит к недостаточности функции андрогенового рецептора, что в свою очередь может вызвать нарушение сперматогенеза.

Некоторые авторы отметили, что короткие CAG-повторы гена *AR* ассоциированы с раком простаты [15] и синдромом поликистозных яичников [16], в то же время длинные CAG-повторы ассоциированы со средне тяжелой маскулинизацией [17], раком молочной желе-

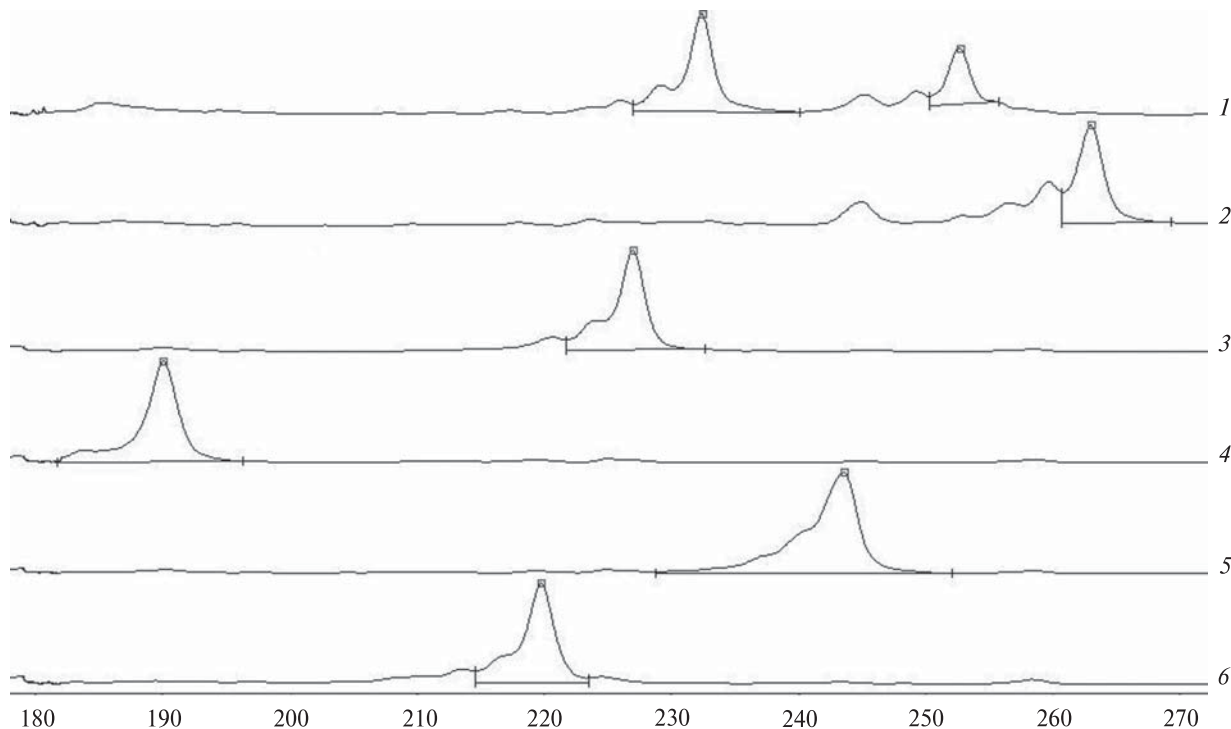


Рис. 3. Флюорограмма продуктов амплификации последовательности ДНК в области CAG-повторов в экзоне 1 гена *AR* (A.L.F.-express): 1 – маркер 20 CAG-повторов и 26 CAG-повторов; 2 – 29 CAG-повторов; 3 – 18 CAG-повторов; 4 – 7 CAG-повторов; 5 – 23 CAG-повтора; 6 – 16 CAG-повторов; по горизонтали – п.н.

зы [18] и сниженной фертильностью у мужчин [14]. Другие исследователи установили, что экспансия тринуклеотидных повторов может приводить к разным нейродегенеративным заболеваниям: спинальной и бульбарной мышечной атрофии (СБМА), синдрому ломкой X-хромосомы, хорее Гентингтона, спиноцеребральной атаксии типа 1, атаксии Фридриха и болезни Мочадо-Джозефа [19, 20]. Также известно, что мутации в CAG-повторах в экзоне 1 гена *AR* приводят к нарушениям сперматогенеза [21].

Целью настоящего исследования было выяснение ассоциации полиморфизма количества CAG-повторов в экзоне 1 гена *AR* с нарушением сперматогенеза.

Материалы и методы. В исследование были включены пациенты с различными формами нарушения сперматогенеза (количественные и/или качественные изменения показателей спермограммы), проходившие курс лечения бесплодия в IVF-клиниках: «ИСИДА-IVF» (Киев), «Надия» (Киев), «Виктория» (Киев), «ИСИДА-

Днепр-IVF» (Днепропетровск), а также в Институте репродуктивной медицины (Киев), Институте генетики репродукции (Киев) и Институте наследственной патологии (Львов). Все пациенты были проинформированы и дали согласие на участие в исследовании.

Материалом для исследования были образцы периферической крови. ДНК из образцов крови выделяли стандартным методом – путем гидролиза лизатов клеток протеиназой К с последующей фенольно-хлороформной экстракцией [22].

Исходя из параметров спермограммы, исследуемых индивидов разделили на две группы: 68 человек с азооспермией (полное отсутствие сперматозоидов в эякуляте) и 160 человек с олигозооспермией ($<20 \cdot 10^6$ сперматозоидов в 1 мл).

Контрольную группу составили 124 фертильных мужчины, у которых есть хотя бы один ребенок, зачатый естественным образом.

Анализ количества CAG-повторов в экзоне 1 гена *AR* проводили с помощью полимеразной цепной реакции (ПЦР) по разработанным

нами протоколам, используя следующие праймеры: А (меченый Cy5): 5'-tccagaatctgttccagagcgtgc-3'; Б: 5'-gctgtgaaggttgctgttcctcat-3'. Продукты ПЦР анализировали в 1,8%-ном агарозном геле. Фрагментный анализ флуоресцентно меченых продуктов ПЦР осуществляли с использованием автоматического флуоресцентного анализатора «A.L.F.-express» («Amersham Pharmacia Biotech», Швеция) (рис. 3).

После сканирования A.L.F.-гель анализировали с помощью программы ALFwin Sequence Analyser 2.11 («Amersham Pharmacia Biotech», Швеция). Для определения точного количества CAG-повторов секвенировали на генетическом анализаторе ABI 3130 три разных аллеля (7, 20, 33), которые в дальнейшем использовались как референс-образцы при фрагментном анализе.

Статистическую обработку данных осуществляли с помощью стандартного теста Фишера [23].

Результаты исследований и их обсуждение. В группе мужчин с олигозооспермией фиксировали 19 различных аллельных вариантов в диапазоне от 14 до 33 CAG-повторов с наиболее частым аллелем (19,4 %), имеющим 21 повтор

(рис. 4). В то же время в контрольной группе регистрировали 17 различных аллельных вариантов в диапазоне от 11 до 31 CAG-повторов с наиболее частыми аллелями (14,5 %) с 20 и 21 повторами.

В группе мужчин с азооспермией наблюдали 13 различных аллельных вариантов в диапазоне от 7 до 27 CAG-повторов с наиболее частыми аллелями (16,2 %), имеющими 20 и 23 повтора (рис. 5).

Количество CAG-повторов менее 18 клинически связывают с повышенным риском развития рака предстательной железы, более ранним возрастом манифестации заболевания, его тяжестью и повышением вероятности возникновения метастазов. Это, скорее всего, может быть связано с гиперэкспрессией андрогенового рецептора [15, 24, 25]. Показано также, что снижение длины полиглутаминового тракта до размеров менее 16 глутаминовых остатков тесно связано с нарушением продукции спермы у бесплодных мужчин в японской популяции [26].

В нашем исследовании выявлена достоверная разница ($P < 0,01$) по частоте встречаемости

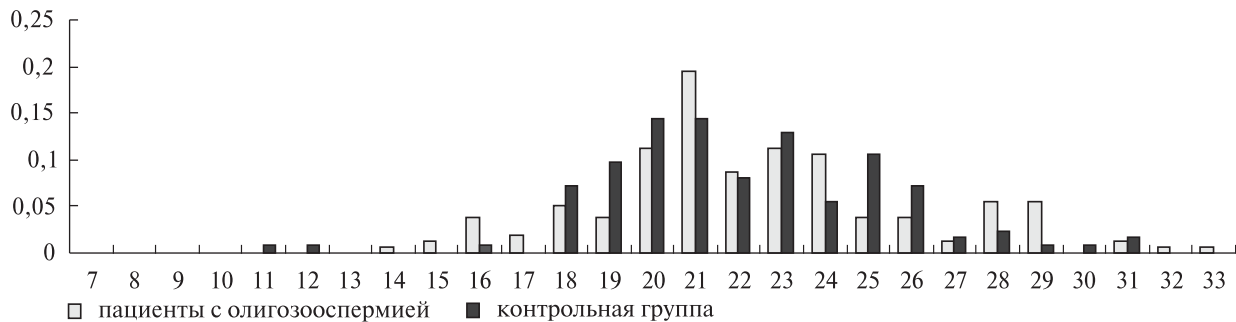


Рис. 4. Распределение аллельных вариантов CAG-повторов в экзоне 1 гена AR среди мужчин с олигозооспермией и контрольной группой: по вертикали – частота, %; по горизонтали – CAG-повторы

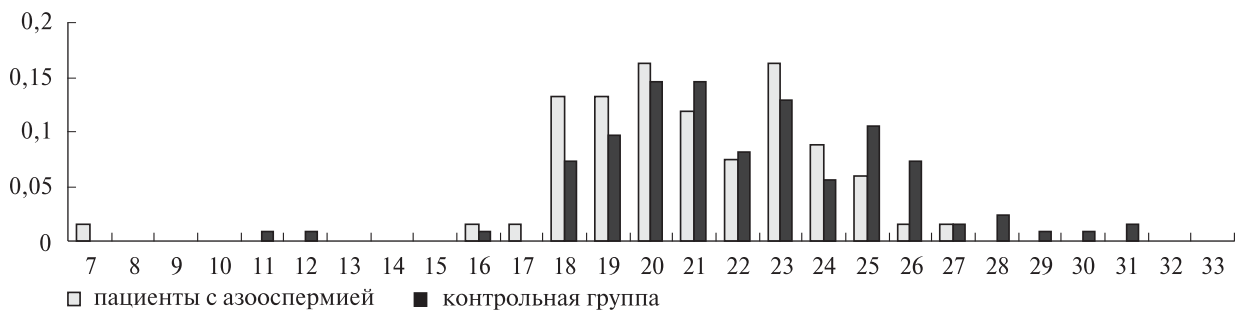


Рис. 5. Распределение аллельных вариантов CAG-повторов в экзоне 1 гена AR среди мужчин с азооспермией и контрольной группой: по вертикали – частота, %; по горизонтали – CAG-повторы

ти коротких аллелей (в интервале до 18 CAG-повторов) между контрольной группой (2,4 %) и группами мужчин с азооспермией (17,7 %) и олигозооспермией (12,5 %) (таблица).

Интересно отметить, что в группе пациентов с азооспермией у мужчины с отсутствием каких-либо половых клеток в биоптате яичек мы идентифицировали семь CAG-повторов (рис. 3). Ранее было показано, что у индивидов с короткими участками CAG-повторов происходит нарушение андроген-зависимых тканей. При уменьшении длины CAG-повторов возрастает чувствительность тканей к андрогенам, соответственно повышается уровень тестостерона. Повышение дозы тестостерона ингибирует фолликулостимулирующий гормон (ФСГ), действующий на клетки Сертоли, в которых происходит дозревание спермиев во время первой фазы мейоза. Таким образом, снижение уровня ФСГ может негативно влиять на сперматогенез [2]. Исходя из всего вышесказанного, можно предположить, что у пациента с азооспермией аллель с семью CAG-повторами может ассоциироваться с нарушением начальных стадий сперматогенеза.

Ранее было показано, что увеличение полиглутаминового тракта (более 28 глутаминовых остатков) у мужчин с бесплодием ассоциировано с повышением риска развития бесплодия в 4 раза [14].

В нашем исследовании в группе мужчин с олигозооспермией доля индивидов с аллельными вариантами более 28 CAG-повторов (13,8 %) была достоверно выше ($P < 0,01$), чем в контрольной группе (5,7 %) (таблица). Необходимо отметить, что аллели с увеличенным количеством повторов (32 и 33) были идентифицированы только у мужчин с олигозооспермией (рис. 4). Это может подтверждать гипотезу о том, что экспансия CAG-повторов ассоциирована с недостаточностью андрогенового рецептора, что, возможно, приводит к утрате чувствительности тканей к андрогенам и в свою очередь влияет на процесс сперматогенеза [27]. У пациентов с длинными полиглутаминовыми аллелями также наблюдалась тенденция к более тяжелым дефектам сперматогенеза [14]. Известно, что тестостерон стимулирует размножение сперматогониев и мейоз сперматозоидов. Дефицит тестостерона может при-

Частота встречаемости коротких и длинных CAG-повторов в исследуемых группах

Исследуемые группы	Количество индивидов с CAG-повторами			
	18 и менее		28 и более	
	n	%	n	%
Мужчины с азооспермией (n = 68)	12	17,7	0	0
Мужчины с олигозооспермией (n = 160)	20	12,5	22	13,8
Контроль (n = 124)	3	2,4	7	5,7

вести к торможению сперматогенеза и, как следствие, к бесплодию [2]. Исходя из того, что длинные CAG-повторы в нашем исследовании фиксировали преимущественно у мужчин с олигозооспермией, мы предполагаем, что в этих случаях произошло нарушение финальных стадий сперматогенеза.

Выводы. В группе мужчин с азооспермией наблюдали достоверное семикратное преобладание коротких CAG-повторов (менее 18) по сравнению с контрольной группой. Это предположительно свидетельствует о том, что наличие указанных аллелей может ассоциироваться с нарушением первичных стадий сперматогенеза, в частности, стадии созревания. Частота аллелей с длинными CAG-повторами (более 28) была достоверно выше в группе мужчин с олигозооспермией по сравнению с контрольной группой. Вероятно, упомянутые аллели могут ассоциироваться с нарушением финальных стадий сперматогенеза. Полученные нами данные свидетельствуют о роли разных аллельных вариантов полиморфизма CAG-повторов экзона 1 гена *AR* в процессах дифференциации андроген-чувствительных тканей и нарушении сперматогенеза как такового.

*O.A. Fesai, S.A. Kravchenko,
M.Ya. Tyrkus, G.V. Makuh, V.M. Zinchenko,
G.V. Strelko, L.A. Livshits*

ANDROGEN RECEPTOR CAG GENE
POLYMORPHISM AMONG AZOOSPERMIC
AND OLIGOZOOSPERMIC MEN
FROM UKRAINE

The number of CAG repeats of exon 1 of *AR* gene was determined in a group of 228 infertile males with azoospermia (n = 68) and oligozoospermia (n = 160) as well as in

control group (124 proven fathers) by fluorescent polymerase chain reaction amplification followed by fragment analysis on automated fluorescent analyzer «A.L.F.-express». The frequency of alleles with CAG-repeats ≤ 18 was significantly higher ($P < 0,01$) in the group of patients with azoospermia (17,7 %) comparing with the control group (2,4 %) as well as in the group of patients with oligozoospermia (12,5 %) comparing with the control group (2,4 %). The frequency of alleles with CAG-repeats ≥ 28 significantly differed ($P < 0,01$) between the group of patients with oligozoospermia (12,5 %) and the control group (2,4 %). Our data suggest an association between CAG repeats number and impaired spermatogenesis in azoospermic and oligozoospermic males.

О.А. Фесай, С.А. Кравченко,
М.Я. Тыркус, Г.В. Макух, В.М. Зінченко,
Г.В. Стрелко, Л.А. Лівшиць

САG-ПОЛІМОРФІЗМ ГЕНА
АНДРОГЕНОВОГО РЕЦЕПТОРА У ЧОЛОВІКІВ
З АЗОСПЕРМІЄЮ ТА ОЛІГОЗОСПЕРМІЄЮ
З УКРАЇНИ

Аналіз кількості САG-повторів в екзоні 1 гена *AR* проводили серед 228 чоловіків із непліддям (68 індивідів із азооспермією, 160 індивідів із олігозооспермією) та 124 фертильних чоловіків, які склали контрольну групу, за допомогою полімеразної ланцюгової реакції з подальшим фрагментним аналізом на автоматичному флуоресцентному аналізаторі «A.L.F.-express». Частота алелів з ≤ 18 САG-повторами була статистично достовірно вища ($P < 0,01$) в групі пацієнтів із азооспермією (17,7 %) в порівнянні з контрольною групою (2,4 %), як і в групі пацієнтів із олігозооспермією (12,5 %) в порівнянні з контрольною групою (2,4 %). Частота алелів з ≥ 28 САG-повторами була статистично достовірно вища ($P < 0,01$) в групі пацієнтів із олігозооспермією (12,5 %) в порівнянні з контрольною групою (2,4 %). Наші дані дозволили припустити наявність асоціації між кількістю САG-повторів і порушенням сперматогенезу у чоловіків із азооспермією та олігозооспермією.

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Kochakian C.D. Definition of androgens and protein of anabolic steroids // *Pharmacol. Ther.* [B]. – 1975. – 1, № 2. – P. 149–177.
2. McLachlan R.I., Wreford N.G., O'donnill L. et al. The endocrine regulation of spermatogenesis: independent roles for testosterone and FSH // *J. Endocr.* – 1996. – 148. – P. 1–9.
3. Mimeault M., Batra S.K. Recent advances on multiple tumorigenic cascades involved in prostatic cancer progression and targeting therapies // *Carcinogenesis.* – 2006. – 27, № 1. – P. 1–22.
4. Lubahn D.B., Brown T.R., Simental J.A. et al. Sequence of the intron/exon junction of the coding region of the human androgen receptor gene and identification of a point mutation in a family with complete androgen insensitivity // *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.* – 1989. – 86. – P. 9534–9538.
5. Brown C.J., Goss S.J., Lubahn D.B. et al. Androgen receptor locus on the human X-chromosome: regional localization to Xq11–12 and description of a DNA polymorphism // *Amer. J. Hum. Genet.* – 1989. – 44. – P. 264–269.
6. Quigley C.A. The androgen receptor: physiology and pathophysiology // *Testosterone: Action, Deficiency, Substitution* / Eds E. Nieschlag, H.M. Behre. – Heidelberg: Springer, 1998. – P. 33–106.
7. Gottlieb B., Lombroso R., Beitel L.K., Trifiro M.A. Molecular pathology of the androgen receptor in male (in) fertility // *RBM Online.* – 2005. – 10, № 1. – P. 42–48.
8. Crocoll A., Zhu C.C., Cato A.C., Blum M. Expression of androgen receptor mRNA during mouse embryogenesis // *Mech. Dev.* – 1998. – 72, № 1/2. – P. 175–178.
9. Yuong W.J., Chang C. Ontogeny and autoregulation of androgen receptor mRNA expression in the nervous system // *Endocrine.* – 1998. – 9, № 1. – P. 79–88.
10. McAbee M.D., DonCarlos L.L. Ontogeny of region-specific sex differences in androgen receptor messenger ribonucleic acid // *Endocrinology.* – 1998. – 139, № 4. – P. 1738–1745.
11. Lubahn D.B., Joseph D.R., Sullivan P.M. et al. Cloning of human androgen receptor complementary DNA and localization to the X-chromosome // *Science.* – 1988. – 240. – P. 327–330.
12. Gelmann E.P. Molecular biology of the androgen receptor // *J. Clin. Oncol.* – 2002. – 20, № 13. – P. 3001–3015.
13. Zitzmann M., Brune M., Kornmann B. et al. The CAG repeat polymorphism in the androgen receptor gene affects bone density and bone metabolism in healthy males // *Clin. Endocrinol.* – 2001. – 55. – P. 649–657.
14. Tut T.G., Ghadessy F., Trifiro M.A. et al. Long polyglutamine tracts in the androgen receptor are associated with reduced transactivation, defective sperm production and male infertility // *J. Clin. End. Met.* – 1997. – 82. – P. 3777–3782.
15. Giovannucci E., Stampfer M.J., Krithivas K. et al. The CAG repeat within the androgen receptor gene and its relationship to prostate cancer // *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.* – 1997. – 94. – P. 3320–3323.
16. Mifsud A., Ramirez S., Yong E.L. Androgen receptor gene CAG trinucleotide repeats in anovulatory infertility and polycystic ovaries // *J. Clin. Endocr. Metab.* – 2000. – 85. – P. 3484–3488.
17. Lim H.N., Chen H., McBride S. et al. Longer polyglutamine tracts in the androgen receptor are associated with

- moderate to severe undermasculinized genitalia in XY males // *Hum. Mol. Genet.* – 2000. – **9**, № 5. – P. 829–834.
18. *Haiman C.A., Brown M., Hankinson S.E. et al.* The androgen receptor CAG repeat polymorphism and risk of breast cancer in the Nurses' Health Study // *Cancer Res.* – 2002. – **62**, № 4. – P. 1045–1049.
 19. *La Spada A.R., Wilson E.M., Lubahn D.B. et al.* Androgen receptor gene mutations in X-linked spinal and bulbar muscular atrophy // *Nature.* – 1991. – **352** (6330). – P. 77–79.
 20. *Mitas M.* Trinucleotide repeats associated with human disease // *Nucl. Acids Res.* – 1997. – **25**. – P. 2245–2254.
 21. *Lund A., Juvonen V., Lähdetie J. et al.* A novel sequence variation in the transactivation regulating domain of the androgen receptor in two infertile Finnish men // *Fertil. Steril.* – 2003. – **79**. – P. 1947–1948.
 22. *Maniatis T., Fritsch E.E., Sambrook J.* *Molecular Cloning. A laboratory Manual.* – Cold Spring Harbor Laboratory, 1982. – P. 480.
 23. *Agresti A.* A survey of exact inference for contingency tables // *Statist. Sci.* – 1992. – **7**. – P. 131–153.
 24. *Schoenberg M.P., Hakimi J.M., Wang S. et al.* Microsatellite mutation (CAG24→18) in the androgen receptor gene in human prostate cancer // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* – 1994. – **198** (1). – P. 74–80.
 25. *Irvine R.A., Yu M.C., Ross R.K., Coetzee G.A.* The CAG and GGC microsatellites of the androgen receptor gene are in linkage disequilibrium in men with prostate cancer // *Cancer Res.* – 1995. – **55**. – P. 1937–1940.
 26. *Komori S., Kasumi H., Kanazawa R. et al.* CAG repeat length in the androgen receptor gene of infertile Japanese males with oligozoospermia // *Mol. Hum. Reprod.* – 1999. – **5**. – P. 14–16.
 27. *Yong E.L., Ghadessy F., Wang Q. et al.* Androgen receptor transactivation domain and control of spermatogenesis // *J. Reprod. Fertil.* – 1998. – **3**. – P. 141–144.

Поступила 17.11.08