



## АКУШЕРСТВО, ГИНЕКОЛОГИЯ

УДК: 575.222:636.7.082.13

DOI:10.52419/issn2072-2419.2025.2.321

### ПОЛИМОРФИЗМ ГЕНОВ *FSHR* И *INHBA* У СОБАК РАЗЛИЧНЫХ ПОРОД

Богданова С.С.<sup>1</sup> – мл. науч. сотр. лаборатории биологии развития (ORCID 0009-0007-9411-9887); Крутикова А.А.<sup>1\*</sup> – канд. биол. наук, вед. науч. сотр. лаборатории молекулярной генетики (ORCID 0000-0003-2561-145X); Никиткина Е.В.<sup>1</sup> – канд. биол. наук, вед. науч. сотр. лаборатории биологии развития (ORCID 0000-0002-8496-5277); Рябова А.Е.<sup>1</sup> – мл. науч. сотр. лаборатории молекулярной генетики (ORCID 0000-0003-2362-2892); Мусидрай А.А.<sup>2</sup> – канд. биол. наук, вед. науч. сотр., вед. науч. сотр. отд. жив-ва и рац. природопользования Арктики (ORCID 0000-0002-0079-9938); Племяшов К.В.<sup>3</sup> – член-корр. академии РАН, доктор ветеринарных наук, ректор (ORCID 0000-0002-3658-5886); Волков К.С.<sup>4</sup> – ветеринарный врач (ORCID 0009-0005-7988-528X); Анипченко П.С.<sup>5</sup> – асп. (ORCID 0000-0001-8871-550X).

<sup>1</sup> Всероссийский научно-исследовательский институт генетики и разведения сельскохозяйственных животных – филиал Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Федеральный исследовательский центр животноводства – ВИЖ имени академика Л. К. Эрнста»

<sup>2</sup> ФГБУН «Санкт-Петербургский Федеральный исследовательский центр РАН»

<sup>3</sup> ФГБОУ ВО «Санкт-Петербургский государственный университет ветеринарной медицины»

<sup>4</sup> ООО «ВКС»

<sup>5</sup> Университет Перуджи

\* anntim2575@mail.ru

**Ключевые слова:** геном; собаки; полиморфизм генов; *INHBA* и *FSHR*; эякулят кобелей, *SNP*.

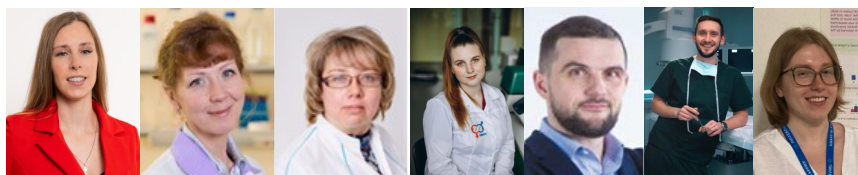
**Key words:** genome; dogs; gene polymorphism; *INHBA* and *FSHR*; male ejaculate, *SNP*.

**Финансирование:** работа проведена в рамках выполнения научных исследований Министерства науки и высшего образования РФ по теме № 124020200127-7.

Поступила: 06.03.2025

Принята к публикации: 06.06.2025

Опубликована онлайн: 20.06.2025



#### РЕФЕРАТ

По мере увеличения объема данных о геномных вариациях,

инструменты, способные оценить функциональное влияние отдельных нуклеотидных последовательностей, становятся все более актуальными. Существует несколько серверов прогнозирования, доступных для интерпретации влияния вариантов в геноме человека, но немногие из них были разработаны для других видов, и ни один из них не был специально разработан для видов, представляющих интерес для ветеринарии, таких как собаки. [1] Рецепторы гликопептидных гормонов млекопитающих являются ключевыми регуляторами репродуктивного развития, и их гомологи широко распространены в животном мире. [2] Интерес нашей научной группы направлен на поиск генных вариаций перспективных для дальнейших исследований ассоциаций в области репродуктологии собак. В связи с этим была выбрана группа генов, потенциально влияющих на качество спермы кобелей. На основании базы данных генов человека GeneCards® были выбраны следующие гены: ген *INHBA* (Inhibin subunit Beta A), связанный с активацией и ингибированием фолликулостимулирующего гормона гипофизом, кодируемый этим геном белок играет важную роль в развитии глаз, зубов и яичек [11], а также ген *FSHR* (follicle stimulating hormone receptor), белок, кодируемый этим геном, относится к семейству 1 рецепторов, связанных с G-белком. Он является рецептором фолликулостимулирующего гормона и участвует в развитии половых желез [11]. Мутации в этом гене вызывают дисгенезию яичников 1-го типа, а также синдром гиперстимуляции яичников у людей [11]. Нами была выдвинута гипотеза, что гены *INHBA* и *FSHR* могут влиять на качество эякулята у кобелей. Исследования в области полиморфизмов генов *INHBA* и *FSHR* которые вошли в данное исследование, были проведены ранее на овцах [3] и быках [4].

#### ВВЕДЕНИЕ / INTRODUCTION

Развитие ветеринарной репродуктологии позволяет использовать новые инструменты для анализа фертильного потенциала производителей. В настоящее время достаточно широко изучены показатели качества эякулята у собак [5], влияние эндокринной системы на показатели качества спермы [6], а также инструменты коррекции возможных известных инфекционных и неинфекционных патологий [7].

С целью получения новых знаний в области вариативности генетического полиморфизма в генах, потенциально связанных с воспроизводительной функцией собак, нами было собрано 37 эякулятов от 37 кобелей различных пород в возрасте от 1 года до 7 лет. Выделено ДНК фенол-хлороформным методом, с последующим секвенированием некоторых локусов кодирующих участков выбранных генов.

В данной публикации мы приведем найденные SNP у кобелей различных пород.

#### МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ / MATERIALS AND METHODS

ДНК выделяли стандартным фенол-хлороформным методом с использовани-

ем протеиназы К [12] из спермы кобелей. Эякуляты кобелей различных пород n=37 собирались мануальным методом. Перед проведением секвенирования исследуемый участок гена был амплифицирован. Последовательности праймеров, которые использовались для амплификации генов: 1. D-FSHR-9e-F cca-ttg-tgg-gta-gcc-ctc-tg, 2. D-FSHR-9e-R gta-ccg-agg-gtg-cct-cta-ct 3. D-FSHR-10e-F tct-ggg-cta-aat-ggc-gta-gag 4. D-FSHR-10e-R tgt-att-tgc-cat-tcc-gga-ccc 5. D-INHBA-2e-F: tcg-ccc-gaa-atg-agt-gag-tg 6. D-INHBA-2e-R: taa-ccg-gct-ctt-tcg-gac-tc. При подборе праймеров для амплификации исследуемого участка гена *FSHR*, *INHBA* использовалась референсная последовательность генома домашней собаки (*Canis familiaris*) из международной базы генетических данных NCBI. Подбор праймеров осуществлялся с помощью приложения Primer-BLAST интегрированного в NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>).

Амплификация проводилась на термоблокере C-1000 (BioRad) в реакционной смеси объемом 10 мкл, состоящей из 2 мкл 5х буфера для Taq (с содержанием 15Мм Mg<sup>2+</sup>), 1,2 мкл смеси dNTP (2,5 мМ), 0,2 мкл каждого из праймеров, 0,2 мкл Taq-полимеразы («Сибэнзим», Ново-

сибирск), а также 0,2 мкл выделенной ДНК и 6 мкл деионизированной воды. После амплификации оценивали качество полученных фрагментов с помощью электрофореза в 2% агарозном геле, а также проводили их ферментативную очистку с помощью набора реагентов Exo-SAP IT (ThermoFisher, USA). Секвенирование амплифицированных фрагментов осуществляли с использованием технологии нанопорового секвенирования на приборе MinION (Oxford Nanopore Technologies, Великобритания). Для приготовления библиотек ДНК применяли набор «Rapid Sequencing Kit. Последовательности прочтений определяли с помощью программы MinKNOW (Oxford Nanopore Technologies, Великобритания). Выравнивание прочтений секвенатора на референсную последовательность осуществляли с помощью программы Minimap2 (v.2.24). Определение вариантов производилось с применением программы longshot (v. 1.0.0), минимальное покрытие для SNP составляло 500 прочтений.

#### РЕЗУЛЬТАТЫ / RESULTS

Нами были секвенированы 9 и 10 участков экзона гена *FSHR*. И на субъединице бета А ингибина 2 экзон гена *INHBA*. Бы-

ли обнаружены однонуклеотидные полиморфизмы. Такие изменения могут приводить к изменению аминокислотного состава полипептида, что, в свою очередь, может повлечь за собой нарушения пространственной третичной и четвертичной структур белка, что является критичным для белка-рецептора, в данном случае рецептора фолликулостимулирующего гормона, который взаимодействует с ФСГ по принципу «ключ-замок». Нарушение пространственно-структурного соответствия рецептора и действующего вещества может приводить снижению эффекта работы полового гормона, что в свою очередь значительно повлияет на репродуктивную функцию [8-10].

Данные по частоте встречаемости генотипов и аллелей гена *INHBA* представлены в таблице 1. При анализе распределения частот генотипов было выявлено сильное смещение в сторону диких генотипов. Особенно это выражено для локуса 10826 (94 % генотипа GG). По локусу 10529 наблюдалась примерно одинаковая частота генотипов СТ и ТТ (17,3 и 13,7% соответственно). В локусе 10529 преобладали аллели С (0,76), а в локусе 10826 аллели G (0,98).

Таблица 1 – Частота встречаемости генотипов и аллелей по двум SNP гена *INHBA* у собак

Генотип	n	Наблюдаемая частота генотипов, %	Частота аллелей
INHBA локус 10529 (CC – дикий генотип)			
CC	20	68,9	C – 0,76 T – 0,24
CT	5	17,3	
TT	4	13,7	
INHBA локус 10826 (GG – дикий генотип)			
GG	30	94	G – 0,98 A – 0,02
AG	1	6	
AA	0	0	

Данные по частоте встречаемости генотипов и аллелей гена *FSHR* представлены в таблице 2. Из данных таблицы видно, что почти по всем найденным SNP наблюдается смещение к ди-

ким генотипам, частота встречаемости от 96 до 100%. Исключение составил локус 162102, в котором было 40 % дикого генотипа CC, 40% гетерозигот СТ и 20% гомозигот ТТ.

Таблица 2 – Частота встречаемости генотипов и аллелей по 8 SNP гена *FSHR* у собак

Генотип	n	Наблюдаемая частота генотипов, %	Частота аллелей
FSHR локус 161722 (GG – дикий генотип)			
GG	33	100	1
FSHR локус 161917 (GG – дикий генотип)			
GG	33	100	1
FSHR локус 162102 (CC – дикий генотип)			
CC	12	40	C – 0,6 T – 0,4
CT	12	40	
TT	6	20	
FSHR локус 162295 (CC – дикий генотип)			
CC	32	100	1
FSHR локус 166566 (CC – дикий генотип)			
CC	24	96	C – 0,98 T – 0,02
CT	1	4	
TT	0	0	
FSHR локус 166783 (GG – дикий генотип)			
GG	24	96	G – 0,98 A – 0,02
AG	1	4	
AA	0	0	
FSHR локус 167443 (GG – дикий генотип)			
GG	24	96	G – 0,98 A – 0,02
AG	1	4	
AA	0	0	
FSHR локус 167550 (GG – дикий генотип)			
GG	21	96	G – 0,98 A – 0,02
AG	1	4	
AA	0	0	

Несмотря на большое фенотипическое разнообразие собак с разной массой тела (от 3 до 80 кг), разным шерстяным покровом (гладкошерстные и длинношерстные), разного назначения пород (декоративные, компаньоны, сторожевые, охотничьи и служебные) частота диких генотипов всех найденных SNP преобладала. Можно предположить, что это связано с отсутствием отбора по репродуктивным показателям, так как селекция в собаководстве в основном направлена на внешний вид и рабочие качества.

Мы планируем продолжить изучение возможных ассоциаций однонуклеотидных замен в найденных SNP генов *FSHR*

и *INHBA* с перспективными репродуктивными показателями, например, такими как качество и криорезистентность спермы. Выявленные ассоциации в дальнейшем могут быть использованы в селекции линий производителей с генетически устойчивым качеством эякулята и способностью к замораживанию и оплодотворяющей способностью.

#### ВЫВОДЫ / CONCLUSION

Нами были описаны новые, не встречавшийся ранее в литературе полиморфизмы в участках генов *FSHR* и *INHBA* у собак. Как видно из полученных данных, наблюдается различная частота мутаций в исследуемых генах. В гене *FSHR* локусах

161722, 162295, 161917 – не было выявлено мутаций у исследованной выборки кобелей, что, возможно, делает неперспективным исследование этих локусов.

Дальнейшие исследования будут перспективны с привлечением большего поголовья кобелей и анализе корреляции качественных и количественных показателей эякулятов относительно полученных данных в этом исследовании

#### **FSHR AND INHBA GENES POLYMORPHISM IN DOGS OF VARIOUS BREEDS.**

**Bogdanova S.S.**<sup>1</sup> – Junior Researcher, Laboratory of Developmental Biology (ORCID 0009-0007-9411-9887), **Krutikova A.A.**<sup>1</sup> \* – PhD of Biological Sciences, Ass. Prof. of Dep. of Genetic and Reproductive Biotechnology (ORCID 0000-0003-2561-145X), **Nikitkina E.V.**<sup>1</sup> – PhD of Biological Sciences, Leading Researcher, Laboratory of Developmental Biology (ORCID 0000-0002-8496-5277), **Ryabova A.E.**<sup>1</sup> Graduate student, junior researcher lab. molecular genetics (ORCID 0000-0003-2362-2892), **Musidray A.A.**<sup>3</sup> – PhD of Biological Sciences, Leading Researcher, Department of Animal Husbandry and Environmental Management of the Arctic (ORCID 0000-0002-0079-9938), Department of Animal Husbandry and Environmental Management of the Arctic, **Plemyashov K.V.**<sup>3</sup> – Professor, Doctor of Veterinary Sciences, Corr. RAS, head.department obstetrics and operative surgery (ORCID 0000-0002-3658-5886), St. Petersburg State University of Veterinary Medicine, **Volkov K.S.**<sup>4</sup> – Veterinarian of VKS LLC (ORCID 0009-0005-7988-528X), **Anipchenko P.S.**<sup>5</sup> – PhD Student at University of Perugia (ORCID 0000-0001-8871-550X)

<sup>1</sup>Russian Research Institute of Farm Animal Genetics and Breeding — Branch of the L.K. Ernst Federal Research Center for Animal Husbandry

<sup>2</sup> St. Petersburg Federal Research Center of the Russian Academy of Sciences

<sup>3</sup> St. Petersburg State University of Veterinary Medicine

<sup>4</sup> VKS LLC

<sup>5</sup> University of Perugia

\* anntim2575@mail.ru

**Financing:** The work was carried out as part of the scientific research of the Ministry of Science and Higher Education of the Russian Federation on topic No. 124020200127-7.

#### **ABSTRACT**

As the amount of data on genomic variations increases, tools capable of assessing the functional impact of individual nucleotide sequences are becoming more relevant. There are several prediction servers available to interpret the effects of variants in the human genome, but few have been developed for other species, and none have been specifically designed for species of interest to veterinary medicine, such as dogs. [1] Mammalian glycopeptide hormone receptors are key regulators of reproductive development, and their homologues are widespread in the animal kingdom.[2]. The interest of our research group is aimed at finding gene variations promising for further research of associations in the field of dog reproduction. In this regard, a group of genes has been selected that potentially affect the sperm quality of males. Based on the GeneCards® human gene database, the following genes were selected: the INHBA (Inhibin subunit Beta A) gene, associated with the activation and inhibition of follicle-stimulating hormone by the pituitary gland, a protein encoded by this gene plays an important role in the development of eyes, teeth, and testicles [11], as well as the FSHR (follicle stimulating hormone receptor) gene. The protein encoded by this gene belongs to the G protein-coupled receptor family 1. It is a receptor for follicle-stimulating hormone and is involved in the development of the sex glands [11]. Mutations in this gene cause type 1 ovarian dysgenesis, as well as ovarian hyperstimulation syndrome in humans [11]. We hypothesized that the INHBA and FSHR genes may affect the quality of ejaculate in males. Studies in the field of INHBA and FSHR gene polymorphisms, which were



included in this study, were previously conducted on sheep [3] and bulls [4].

# СПИСОК ИСТОЧНИКОВ

1. Capriotti E. Fido-SNP: the first webserver for scoring the impact of single nucleotide variants in the dog genome / E. Capriotti, L. Montanucci, G. Profiti, I. Rossi, D. Giannuzzi, L. Aresu, P. Fariselli // *Nucleic Acids Res.* – 2019. - W136-W141. doi: 10.1093/nar/gkz420
2. Cho S. The C. elegans glycopeptide hormone receptor ortholog, FSHR-1, regulates germline differentiation and survival / S. Cho, K. Rogers, D. // *Fay . Curr Biol.* – 2007. - W203-W212. doi: 10.1016/j.cub.2006.12.027
3. Zilaitiene B. The impact of FSH receptor polymorphism on time-to-pregnancy: a cross-sectional single-centre study. / B. Zilaitiene, M. Dirzauskas, R. Verkauskiene // *BMC Pregnancy Childbirth.* – 2018.- W272 doi: 10.1186/s12884-018-1910-2
4. Nikitkina E. Search for Associations of FSHR, INHA, INHAB, PRL, TNP2 and SPEF2 Genes Polymorphisms with Semen Quality in Russian Holstein Bulls (Pilot Study) / E. Nikitkina, A. Krutikova, A. Musidray, K. Plemyashov // *Animals.* – 2021.- Oct 2;11(10)- W2882. doi: 10.3390/ani11102882
5. Abah K. Effect of male age on semen quality in domestic animals: potential for advanced functional and translational research / K. Abah, A. Fontbonne, A. Partyka , W. Nizanski // *Vet Res Commun.* – 2023.- Sep;47(3) - W1125-W1137. doi: 10.1007/s11259-023-10159-1
6. Hallberg I. Endocrine and dog factors associated with semen quality / I. Hallberg, H. Olsson, H. Lau , S. Wallander, A. Snell, D. Bergman, B. Holst // *Sci Rep.* – 2024.- Jan 6;14(1)- W718. doi: 10.1038/s41598-024-51242-0
7. Domrazek K. The Impact of Microorganisms on Canine Semen Quality / K. Domrazek, P. Konieczny, M. Majka, M. Czopowicz, P. Jurka // *Animals (Basel).* – 2024.- Apr 23;14(9)- W1267. doi: 10.3390/ani14091267
8. Bhartiya D. An overview of FSH-FSHR

- biology and explaining the existingconundrums / D. Bhartiya, H. Patel // *Journal of ovarian research.* – 2021.- 14(1)- W144. doi: 10.1186/s13048-021-00880-3
9. Abeygunawardana D. Effect of LHCGR and FSHR gene polymorphisms on fertility traits and milk yield of cross-bred dairy cows in Sri Lanka / D. Abeygunawardana, R. Ranasinghe, S. De Silva, P. Deshapriya, Gamika, J. Rajapakse // *Anim Biotechnol.* – 2023.- Nov;34(5)- W1719-W1726. doi: 10.1080/10495398.2022.2044346
10. Sharifiyazdi H. Characterization of polymorphism in the FSH receptor gene and its impact on somereproductive indices in dairy cows / H. Sharifiyazdi, A. Mirzaei, Z. Ghaanaatian // *Anim Reprod Sci.* – 2018.- Jan;188- W45-W50. doi: 10.1016/j.anireprosci.2017.11.006
11. GeneCards the human gene database [Электронный ресурс]. — Режим доступа: <https://www.genecards.org> , свободный — (22.04.2025г)
12. Выделение ДНК теоретические основы [Электронный ресурс]. — Режим доступа: <https://vniigen.ru/wp-content/uploads/2023/07/%D0%A0%D1%8F%D0%B1%D0%BE%D0%B2%D0%B0-%D0%90.%D0%95> , свободный — (22.04.2025г)

# REFERENCES

1. Capriotti E. Fido-SNP: the first webserver for scoring the impact of single nucleotide variants in the dog genome / E. Capriotti, L. Montanucci, G. Profiti, I. Rossi, D. Giannuzzi, L. Aresu, P. Fariselli // *Nucleic Acids Res.* – 2019. - W136-W141. doi: 10.1093/nar/gkz420
2. Cho S. The C. elegans glycopeptide hormone receptor ortholog, FSHR-1, regulates germline differentiation and survival / S. Cho, K. Rogers, D. // *Fay . Curr Biol.* – 2007. - W203-W212. doi: 10.1016/j.cub.2006.12.027
3. Zilaitiene B. The impact of FSH receptor polymorphism on time-to-pregnancy: a cross-sectional single-centre study. / B. Zilaitiene, M. Dirzauskas, R. Verkauskiene // *BMC Pregnancy Childbirth.* – 2018.- W272 doi: 10.1186/s12884-018-1910-2
4. Nikitkina E. Search for Associations of

- FSHR, INHA, INHAB, PRL, TNP2 and SPEF2 Genes Polymorphisms with Semen Quality in Russian Holstein Bulls (Pilot Study) / E. Nikitkina, A. Krutikova, A. Musidray, K. Plemyashov // *Animals*. – 2021.- Oct 2;11(10)- W2882. doi: 10.3390/ani11102882
5. Abah K. Effect of male age on semen quality in domestic animals: potential for advanced functional and translational research / K. Abah, A. Fontbonne, A. Partyka, W. Nizanski // *Vet Res Commun*. – 2023.- Sep;47(3) - W1125-W1137. doi: 10.1007/s11259-023-10159-1
6. Hallberg I. Endocrine and dog factors associated with semen quality / I. Hallberg, H. Olsson, H. Lau, S. Wallander, A. Snell, D. Bergman, B. Holst // *Sci Rep*. – 2024.- Jan 6;14(1)- W718. doi: 10.1038/s41598-024-51242-0
7. Domrazek K. The Impact of Microorganisms on Canine Semen Quality / K. Domrazek, P. Konieczny, M. Majka, M. Czopowicz, P. Jurka // *Animals (Basel)*. – 2024.- Apr 23;14(9)- W1267. doi: 10.3390/ani14091267
8. Bhartiya D. An overview of FSH-FSHR biology and explaining the existing contradictions / D. Bhartiya, H. Patel // *Journal of ovarian research*. – 2021.- 14(1)- W144. doi: 10.1186/s13048-021-00880-3
9. Abeygunawardana D. Effect of LHCGR and FSHR gene polymorphisms on fertility traits and milk yield of cross-bred dairy cows in Sri Lanka / D. Abeygunawardana, R. Ranasinghe, S. De Silva, P. Deshapriya, Gamika, J. Rajapakse // *Anim Biotechnol*. – 2023.- Nov;34(5)- W1719-W1726. doi: 10.1080/10495398.2022.2044346
10. Sharifiyazdi H. Characterization of polymorphism in the FSH receptor gene and its impact on somereproductive indices in dairy cows / H. Sharifiyazdi, A. Mirzaei, Z. Ghanaatian // *Anim Reprod Sci*. – 2018.- Jan;188- W45-W50. doi: 10.1016/j.anireprosci.2017.11.006
11. GeneCards the human gene database [Electronic resource]. — Access mode: <https://www.genecards.org>, free — (04/22/2025)
12. DNA isolation theoretical foundations [Electronic resource]. — Access mode: <https://vniigen.ru/wp-content/uploads/2023/07/%D0%A0%D1%8F%D0%B1%D0%BE%D0%B2%D0%B0-%D0%90.%D0%95>, free — (04/22/2025)