

- coronary heart disease in Japanese noninsulin-dependent diabetes mellitus//J Clin Endocrinol Metab - 1997. - Vol. 82. – P. 2257-2260.
18. Suehiro T, Nakauchi Y, Yamamoto M et al. Paraoxonase gene polymorphism in Japanese subjects with coronary heart disease//Int J Cardiol. – 1996. – Vol.57. – P.69-73.
  19. Huang Q, Lui Y.H., Yang Q.D. et al Human serum paraoxonase gene polymorphism, Q192R and L55M, are not associated with the risk of cerebral infarction in Chinese Han population//Neurol.Res. – 2006. – Vol 28(5). – P. 549-554.
  20. Cavalli-Sforza L., Bodmer W. The genetics of human populations. - San Francisco: Freeman, 1971. - 962 p.
  21. Алтухов Ю.П. Генетические процессы в популяциях.– М.: Наука, 2003.– 431 с.
  22. Walsh P., Metzger D., Higuchi R. Chelex 100 as a Medium for Extraction of DNA for PCR-Based Typing from Forensic Material // BioTechniques. – 1991.– №10. – P.506.
  23. СОУ85.2-37-206:2004 Методи виділення ДНК із біопроб за допомогою гуанідинізоціонату та реагенту “Chelex-100” для проведення полімеразної ланцюгової реакції.
  24. Мустафина О.Е., Данилова В.В., Зуева Л.П. и др.Полиморфизм 192Q/R гена параоксоназы 1 в популяции татар: анализ ассоциаций с сердечно-сосудистыми заболеваниями, содержанием липидов в крови и грациями возраста//Медицинская генетика: Материалы V съезда Российского общества медицинских генетиков. – 2005. - № 5. – С.223.
  25. Ombres D., Pannitteri G., Montali A. et al. Gln-Arg192 polymorphism of human paraoxonase gene is not associated with coronary artery disease in Italian patients //Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol. – 1998. – V.18. – P.1611–1616.
  26. Sakai T., Matsuura B., Onji M. Serum paraoxonase activity and genotype distribution in Japanese patients with diabetes mellitus // Internal.Medicine. – 1998. – Vol.37, №7. – P. 581-584.
  27. Kotur-Stevuljevic J., Spasic S., Stefanovic A. et al. Paraoxonase-1 (PON1) activity, but not PON1 (Q192R) phenotype, is a predictor of coronary artery disease in a middle-ages Serbian population // Clin.Chem.Lab.Med. – 2006. – Vol. 44(10). – P.1206-1213
  28. Gan K., Smolen A., Eskerson H. et al. Purification of human serum paraoxonase/arylesterase Evidense for one esterase catalyzing both activities//Drug.Metab.Dispos. – 1991. – Vol. 19. – P. 100-106.

### Резюме

Зібрана інформація про 110 (79 – чоловіків, 31 – жінка) практично здорових мешканців м. Харкова, віком від 20 до 60 років. Частота алеля *Q* гена параоксонази серед здорових мешканців м.Харкова складає 0,70; частота алеля *R* – 0,30. Розподіл частот генотипів серед чоловіків і жінок відповідає розподілу, очікуваному по рівнянню Харді-Вайнберга ( $\chi^2=4,33$ ;  $P<0,05$ ).

Собрана информация о 110 (79 – мужчины, 31 – женщина) практически здоровых жителях г.Харькова, в возрасте от 20 до 60 лет. Частота алеля *Q* гена параоксоназы среди здоровых жителей составляет 0,70; частота алеля *R* – 0,30. Распределение частот генотипов среди мужчин и женщин соответствует распределению, ожидаемому по уравнению Харди-Вайнберга ( $\chi^2=4,33$ ;  $P<0,05$ ).

The data about 110 (male/female: 79/31, age from 20 to 60 years) healthy Kharkov habitants were collected. Frequency of *Q* allele of paraoxonase gene is 0,70; frequency of *R* allele - 0,30. Distributions of genotype frequencies among men and women did not deviate from Hardy-Weinberg's equilibrium ( $\chi^2=4,33$ ;  $P<0,05$ ).

**ТИРКУС М.Я., МАКУХ Г.В., БІЛЕВИЧ О.Б., ЗАСТАВНА Д.В.**

ДУ "Інститут спадкової патології АМН України",

Україна, 79000, м.Львів, вул..М.Лисенка 31а, e-mail:tyrkus.m@ihp.lviv.ua

## ВНЕСОК ОСНОВНИХ ГЕНЕТИЧНИХ ЧИННИКІВ В ЕТІОЛГІЇ ПОРУШЕНЬ СПЕРМАТОГЕНЕЗУ

Близько 15% подружніх пар є неплідними. Внесок чоловічого фактору в структуру непліддя складає 30 – 50%. Причини чоловічого непліддя – різноманітні та

до кінця не з'ясовані. Внесок генетичної компоненти при цьому сягає 10-20%. Найбільш вивченими є хромосомні порушення при неплідді і вони стосуються змін структури та чисельності хромосом, але в роботах останніх років щораз частіше зустрічаються молекулярно-генетичні дослідження при чоловічому неплідді[1].

Зокрема, відомо, що два гени Y-хромосоми – ген детермінації статі (SR $\text{Y}$ ) та ген фактору азооспермії (AZF) безпосередньо впливають на фертильність у чоловіків. Ген SR $\text{Y}$  розташований на короткому плечі Y-хромосоми і відповідає за диференціацію гонад в процесі ембріогенезу. При відсутності всього короткого плеча або його дистальних ділянок індивід втрачає ген SR $\text{Y}$ . При цьому процес розвитку ембріона порушується на стадії диференціації гонад, що призводить до виникнення жіночого фенотипу при чоловічому (46XY) каріотипі. І навпаки, транслокація гена SR $\text{Y}$  з Y на X - хромосому (або аутосому) призводить до формування чоловічого фенотипу при жіночому (46, XX) каріотипі (синдром де ля Шапеля)[2].

На довгому плечі Y-хромосоми ідентифіковано AZF регіон, який містить групу генів, відповідальних за нормальний сперматогенез. Тому, втрата цього регіону, або його сегментів (AZFa, AZFb, чи AZFc) супроводжується порушеннями фертильності. Отже, при делеції довгого плеча Y-хромосоми фенотип залишається чоловічим, а порушення сперматогенезу залежать від розміру втраченого сегменту[3].

Ще однією відомою причиною генетично детермінованої чоловічого непліддя є мутації гена TPBM, які призводять до генітальної форми муковісцидозу (МВ). Так, у 97% чоловіків із МВ діагностується обструктивна азооспермія, яка викликана ізольованим ураженням сім'явивідних протоків при відсутності класичних проявів захворювання. При цій атипичній формі МВ 70-80% пацієнтів з двосторонньою природженою аплазією сім'явивідних протоків мають мутації гена TPBM і у 45-60% знаходять 5T алель поліморфного локусу IVS8polyT[4].

Тому метою роботи було вивчення частоти та спектру найпоширеніших генетичних чинників серед чоловіків з порушеними показниками спермограми.

### **Матеріали і методи**

Всього обстежено 200 чоловіків із порушеними показниками сперматогенезу при діагнозі азоо-, оліго-, астено-, астенотератозооспермія та аспермія.

Всі пацієнти проходили цитогенетичне обстеження із застосуванням GTG- та CBG–диференційного забарвлення препаратів метафазних хромосом, отриманих з культури лімфоцитів [5]. Паралельно, із лейкоцитів периферійної крові цих пацієнтів виділяли ДНК методом висолювання [6] для подальшого молекулярно-генетичного дослідження Y-хромосоми та мутацій гена TPBM.

Наявність гена SR $\text{Y}$  та мікроделеції AZF регіону Y-хромосоми вивчали за допомогою двох мультилокусних ПЛР, у кожній із яких ампліфікували фрагменти трьох AZF (AZFa, AZFb та AZFc) регіонів та контрольного фрагменту гена SR $\text{Y}$ . Аналіз продуктів ПЛР проводили шляхом електрофорезу у 2% агарозному гелі. Досліджували мікроделеції Y-хромосоми AZF-регіону в наступних STS локусах: sY84, sY86, sY127, sY134, sY254, sY255[7]. Відсутність на електрофореограмі певних фрагментів свідчила про наявність мікроделецій у відповідних локусах.

Дослідження мутацій гена TPBM проводили за допомогою ПЛР та подальшого гетеродуплексного, делеційного та рестрикційного аналізу. Залежно від типу досліджуваних мутацій здійснювали електрофорез у агарозному або поліакриламідному гелях. Отримані сигнали порівнювали з маркерами довжин, і на основі цього детектували розміри отриманих фрагментів. Для детекції алелів у триалельній поліморфній послідовності IVSpolyT-5T, 7T чи 9T проводили алель-специфічну ПЛР[8]. Спектр досліджуваних мутацій різнився від переліку мутацій, які досліджуються з метою верифікації класичної форми МВ. Окрім найпоширеніших у популяції Західного регіону України алелів гена TPBM (F508del, G542X, N1303K,

CFTRdele2,3(21kb), W1282X, G551D, R553X, 1717-1G-A), у протокол молекулярно-генетичного дослідження були введені наступні мутації та поліморфні варіанти: R117H, R347P, R347H, R347L, R347C, I336K, R334W, R560T, G551S, Q552X, Y122X, D1270N, 621+1G-T, S549I, S549N [9].

#### **Результати та обговорення**

Каріотипування інфертильних чоловіків із порушеними показниками спермограми виявило аномалії каріотипу у 14 випадках, що складає 7%. Зокрема, у 8 випадках встановлено синдром Кляйнфельтера (каріотип - 47,XXY), у 3 – синдром де ля Шапеля (каріотип – 46,XX), у 1 – дисомію Y- хромосоми (каріотип – 47,XYU), у 2 – структурні перебудови хромосом: каріотип 46,Xdel(Y)(q11)/45,X(23:10) та делецію гетерохроматинового блоку 46,XYqh- і клон 46,Xdel(Y)(q12).

Молекулярно-генетичні дослідження Y-хромосоми у пацієнтів із синдромом Кляйнфельтера, не виявляли жодних змін у AZF-регіоні Y-хромосоми при наявності у всіх SRY-гена. В той час як у всіх трьох пацієнтів із синдром де ля Шапеля встановлено мікроделецію усїєї послїдовності AZF-регіону. Щодо гена SRY, то у 2 пацієнтів з синдромом де ля Шапеля він присутній, а у одного – відсутній.

У групї інфертильних чоловіків з нормальним каріотипом (всього 186 індивїдів), мікроделеції Y-хромосоми діагностовано у 12 осіб з наступним спектром мутацій: мікроделеції субрегіону AZFa – у однієї особи; AZFb - у однієї особи; субрегіонів AZFb+c – у 3 осіб; субрегіону AZFc – у 6 осіб, відсутність усїєї послїдовності AZFa, AZFb та AZFc локусів Y-хромосоми та SRY- гена – у 1 особи. Отже, 6,5% інфертильних чоловіків з нормальним каріотипом мають мікроделеції Y-хромосоми. Причому, найчастїше ушкоджувався субрегіон AZFc, відсутність якого встановлено у 10 із 12 виявлених випадків мутацій. Відносно усїєї групи обстежених інфертильних чоловіків частота мікроделецій Y-хромосоми сягає 7,5%. Отримані дані принципово співпадають із даними інших дослідників, зокрема, Лївшиць Л.А. із співавт.[10].

Особливо слід наголосити, що переважна більшість порушень, описаних вище, утворюється de novo. Причини їх утворення – невідомі, але, разом з тим, вони мають тенденцію до закрїплення у подальших поколіннях. Це необхідно враховувати, при рекомендаціях застосування додаткових репродукційних технологій. Проведення цитота молекулярно-генетичних досліджень у такому випадку є особливо необхідним. При наявності хромосомних чи генних аномалій подружня пара може народити здорову дитину, використовуючи сучасні репродукційні технології, за умови проведення коректної доїмплантаційної чи пренатальної діагностики.

Ще однією причиною чоловічого неплїддя, як зазначалося вище, може бути генїтальна форма муковїсцидозу, яка проявляється у вигляді порушення прохідності, або повної непрохідності сїм'явивїдних протоків, і обумовлюється мутаціями гена ТРБМ[11]. Тому, при наявності у чоловіків порушень сперматогенезу у вигляді олігоастенотератозооспермії, ізольованої олігозооспермії, азооспермії нез'ясованого генезу, зниженому об'ємі сїм'яної плазми, відсутності або низької концентрації фруктози, патологічної в'язкості еякуляту, очевидно, доцїльно проводили молекулярно-генетичне дослідження мутацій гена ТРБМ. Відповідно, спектр порушень спермограм, які зафіксовані в обстежуваних нами чоловіків і перечислені вище у «Матеріалах і методах», передбачає доцїльність вивчення мутацій гена ТРБМ у обстежуваній групї чоловіків – як однієї з причин генетично обумовленого чоловічого неплїддя.

Отримані результати засвідчили, що частота мажорної мутації F508del в обстеженій групї інфертильних чоловіків складає 3,85%. В одному випадку ідентифїковано мутацію R117H. Решта мутацій, а саме: G542X, N1303K, CFTRdele2,3(21kb), W1282X, G551D, R553X, 1717-1G-A, R347P, R347H, R347L, R347C, I336K, R334W, R560T, G551S, Q552X, Y122X, D1270N, 621+1G-T, S549I, S549N у обстежуваній групї пацієнтів не ідентифїковані. Разом з тим, у 17 чоловіків досліджуваної групї детектовано 5T алель поліморфного локусу IVS8polyT, що

становить 8,5%. Результати розподілу генотипів поліморфного локусу IVS8polyT були наступними: 9T/9T генотип виявлено у 1,37%, 7T/9T – у 59,5%, 7T/7T – у 30% та 5T/7T – у 8,5% інфертильних чоловіків.

Таким чином, біля 12% обстежених чоловіків входять в групу ризику по атипівій формі муковісцидозу, що може спричинитися до їх інфертильності. Більше того, родини таких чоловіків потребують більш детального медико-генетичного консультування. Зокрема, при виявленні гетерозиготного носійства мутацій гена ТРБМ у дружини, з метою запобігання народження хворих дітей, рекомендується проводити пренатальну діагностику МВ[12].

Отже, поряд з хромосомними аномаліями та мікрodelеціями Y-хромосоми мутації гена ТРБМ є вагомим чинником в етіології ідопатичного непліддя, що вимагає проведення їх дослідження у чоловіків із порушеними параметрами спермограм нез'ясованого генезу.

### **Висновки**

1. При цитогенетичному дослідженні чоловіків із порушеними процесами сперматогенезу у 7 % випадків виявлено кількісні та структурні зміни хромосом.

2. Серед дослідженої групи інфертильних чоловіків частота мікрodelецій Y-хромосоми становить 7,5%, причому, найчастіше ушкоджено субрегіон AZFc, відсутність якого встановлено у 10 із 12 виявлених випадків мутацій.

3. При проведенні молекулярно-генетичного аналізу мутацій гена ТРБМ детектовано мутації F508del (3,85%), R117H (один випадок) та 5T алель поліморфного локусу IVS8polyT (8,5%).

4. Отримані результати вказують на вагомий внесок генетичної компоненти у порушеннях сперматогенезу та передбачають необхідність проведення генетичних досліджень в усіх випадках ідопатичного непліддя у чоловіків.

### **Література**

1. *Diemer T., Desjardins C.* Developmental and genetic disorders in spermatogenesis // Human Reproduction Update. 1999.-Vol. 5.- No 2.-P. 120-140.

2. *Layman L. C.* Human gene mutations causing infertility // Journal Medical Genet. 2002.- Vol. 39.- P. 153-161.

3. *Hopps, C.V., Mielnik, A., Goldstein, M., Palermo, G.D., Rosenwaks, Z. & Schlegel, P.N.* Detection of sperm in men with Y chromosome microdeletions of the AZFa, AZFb and AZFc regions. Human Reproduction. 2003, 18 1660-1665.

4. *Sertic J., Cvitkovic P., Myers M., Randall K. Saiki, Stavljenic Rukavina A.* Genetic Markers of Male Infertility: Y Chromosome Microdeletions and Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Gene Mutations. Croatian Medical Journal. 2001.-Vol. 42.- No 4.-P. 416-420.

5. *Пілінська М.А., Дибський С.С., Шеметун О.В., Талан О.О.* Рівень спонтанних хромосомних аберацій у дітей з екологічно чистого регіону України, встановлений при цитогенетичному аналізі рівномірно та диференційно забарвлених метафазних хромосом // Цитология и генетика.-2004.-40, №6.-С.45-48.

6. *Miller S.A., Dykes D.D., Polesky H.F.* A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells // Nucleic Acids Research. – 1988. – Vol.16. – No 3. – P.1215.

7. *Simoni M., Bakker E., Krausz C.* EAA/EMQN best practice guidelines for molecular diagnosis of y-chromosomal microdeletions // International J. of Andrologi.- 2004.- No 27.- P. 240-249.

8. *Маниатис Т., Фриз Е.Е, Сэмбрук Ж.* Молекулярное клонирование.- М. Мир.- 1985.- С.420.

9. *Kusić J, Radojković D, Maletić V, Branković S, Savić A.* Mutations and polymorphisms in CFTR genes in infertile men with oligospermia or azoospermia. Srp Arh Celok Lek. 2002 Jan-Feb;130(1-2):1-6.

10.Лівшиць Л. А., Ясінська О. А. Роль мікрodelецій хромосомної ділянки Yq11 в розвитку необструктивних форм чоловічого безпліддя // Цитология и генетика.-2002.-№5.-С.73-78.

11.Kanavakis E. Tzetis M. Antoniadis T. Cystic fibrosis mutation screening in CBAVD patients and men with obstructive azoospermia or severe oligozoospermia // Molecular Human Reproduction. –1998. –Vol.4, №4. –P.333-337.

12.Jakubiczka S, Bettecken T, Stumm M Frequency of CFTR gene mutations in males participating in an ICSI programme // Human Reproductions. 1999. –Vol.14, №7. – P. 833-834.

### **Резюме**

Отримані результати вказують на вагомий внесок генетичної компоненти у порушеннях сперматогенезу у чоловіків. Показано високу результативність комплексу цито- та молекулярно-генетичних досліджень при неплідді у чоловіків: у 7% випадків встановлені порушення кариотипу; у 7,5% - мікрodelеції Y-хромосоми; детектовано мутації гена ТРБМ та 5Т алель поліморфного локусу IVS8polyT.

Полученные результаты свидетельствуют о существенном влиянии генетической компоненты при нарушениях сперматогенеза у мужчин. Показана высокая результативность комплекса цито- и молекулярно-генетических исследований при бесплодии у мужчин: в 7% установлены изменения кариотипа; 7,5% - микрodelеции Y-хромосома; найдены мутации гена ТРБМ и 5Т алель полиморфного локуса IVS8polyT.

The final results are the evidence of the essential influence of the genetic component on male infertility. It was shown high effectiveness of the complex of cyto- and molecular-genetic researches at male infertility: quantitative and structural chromosome abnormalities were found in 7%, Y-chromosome microdeletions - in 7,5%, CFTR gene mutations and 5T allele of polymorphic locus IVS8polyT are found in males with spermatogenesis failure.

### **ФИЛИПЦОВА О.В.1 , АТРАМЕНТОВА Л.А.**

*Национальный фармацевтический университет,*

*Украина, 61002, Харьков, ул. Пушкинская, 53, e-mail: philiptsova@yahoo.com*

*Харьковский национальный университет имени В.Н. Каразина,*

*Украина, 61077, Харьков, пл. Свободы,4, e-mail:wshkoda23@rambler.ru*

### **ГЕНЕАЛОГИЧЕСКАЯ КУЛЬТУРА В УКРАИНЕ: ФЕНОМЕН ЭТНИЧЕСКОЙ ПРИНАДЛЕЖНОСТИ**

При решении различных проблем, связанных с наследственностью человека, нередко возникает проблема получить точную генеалогическую информацию. Одним из важнейших показателей является этническая принадлежность – национальность [1-3]. Этот показатель необходим для корректного применения ДНК-маркёров в криминалистике и медицинской генетике [4-8]. В последнее время в Украине, как и в других странах мира, в связи с повышением доли внебрачных рождений, применением репродуктивных технологий растёт число детей, не имеющих генетического родства с одним или обоими родителями [9]. Воспитание детей в неполных семьях способствует утрате информации о родственниках по одной из линий, как правило, отцовской. Отсутствие в Украине реестров близнецов и приёмных детей также осложняет работу генетиков. Кроме того, население Украины не привычно к популяционным исследованиям и выражает непонимание и обеспокоенность относительно использования данных. В паспорте гражданина Украины отсутствует позиция «национальность». Отмечается, что молодое поколение отождествляет понятие