

Г.Б. ЛІВШИЦЬ^{1,2}, С.А. КРАВЧЕНКО¹,
Н.В. ГРИЩЕНКО¹, І.А. СУДОМА³

¹Інститут молекулярної біології і генетики НАН України,
м. Київ, вул. Заболотного 150, livshits@imbg.org.ua

²Національний технічний університет України «КПІ»,
факультет біотехнології і біотехніки

³Клініка «ISIDA IVF»

ВИКОРИСТАННЯ МЕТОДІВ ДНК-АНАЛІЗУ ДЛЯ ДІАГНОСТИКИ СПАДКОВИХ ФОРМ ПЕРЕДЧАСНОГО ВИСНАЖЕННЯ ЯЄЧНИКІВ



*Розроблено методи ДНК-аналізу мутації 769G→A ге-
на INH α1 та алейного поліморфізму кількості CGG-
повторів гена FMR1 як основи для створення тест-сис-
тем для діагностики генетично обумовлених форм
передчасного виснаження яєчників. Встановлено, що
частота мутації 769G→A в популяції жінок України за
попередніми розрахунками становить 2,8 %. За резуль-
татами аналізу алейного поліморфізму кількості CGG-
повторів гена FMR1 в групі жінок-донорів яйцеклітин
(215 осіб) виявлено 5 осіб, які мали кількість CGG-пов-
торів, що перевищують норму (42 копії). Таким чином,
частота осіб з алейями високого ризику премутації в гені
FMR1 сягає 2,3 %. Результати нашого дослідження
свідчать про актуальність генетичного тестування му-
тацій генів INH α1 та FMR1 у всіх жінок репродуктив-
ного віку з метою прогнозу передчасного виснаження
яєчників та запобігання народження дітей, хворих на
синдром ламкої X-хромосоми.*

© Г.Б. ЛІВШИЦЬ, С.А. КРАВЧЕНКО, Н.В. ГРИЩЕНКО,
І.А. СУДОМА, 2005

Вступ. Одним з найбільш розповсюджених порушень гаметогенезу у жінок є передчасне виснаження яєчників (ПВЯ). Встановлено, що на цю патологію страждає близько 1—3 % жінок репродуктивного віку. ПВЯ характеризується вторинною аміоресією, яка пов'язана з підвищеною функцією естрогену і підвищеним рівнем гонадотропіна у жінок до 40 років [1]. ПВЯ стає великою проблемою для подружніх пар, коли жінка відкладає створення сім'ї на пізній період. Це веде до двох серйозних наслідків — до порушення репродуктивної функції, тобто безпліддя, і до патологій, які пов'язані з гіперестрогенією у молодому віці, що передбачає збільшення ризику остеопороза та коронарної серцевої недостатності [2].

Встановлено, що ПВЯ є гетерогенним захворюванням і на сьогоднішній день ще не всі його наслідки можливо ідентифікувати [2—4].

Показано, що хіміотерапія або радіотерапія призводять до різкого зменшення кількості фолікулів і можуть визивати ПВЯ. Хоча аутоімунні захворювання спостерігаються у 10—20 % жінок з ПВЯ, роль аутоімунних процесів, а також деяких інфекцій у розвитку патології лишається не з'ясованою до кінця [2].

Також передбачається, що таке захворювання, як паратит, може викликати оофритизм, який має місце при виснаженні яєчників. Іншими більш рідкісними чинниками появи ПВЯ можуть бути галактозимія, недостатність окремих ферментів і порушення сигнальної системи гонадотропіна [5].

На фізіологічному рівні ПВЯ найбільш вірогідно повинно виникати або внаслідок зменшення кількості ооцитів, які формуються під час ембріонального розвитку, або при збільшенні рівня загибелі ооцитів, яке має місце протягом репродуктивного періоду життя. Нещодавно в різних лабораторіях світу було доведено, що ця патологія може мати генетичну природу. Родинні випадки ПВЯ передбачають існування спадкових генетичних дефектів, що мають місце в цих родинах. Частота зустрічаємості жінок з ПВЯ і жінок, які мають родинну історію даного захворювання, істотно відрізняється у різних дослідженнях.

В деяких дослідженнях дана частота складає 5 %, в інших повідомляється про частоту, вищу за 37,5 % [6]. Такі відмінності можна пояснити відсутністю точних клінічних критеріїв діагнозу ПВЯ або відмінностями у популяційній групі

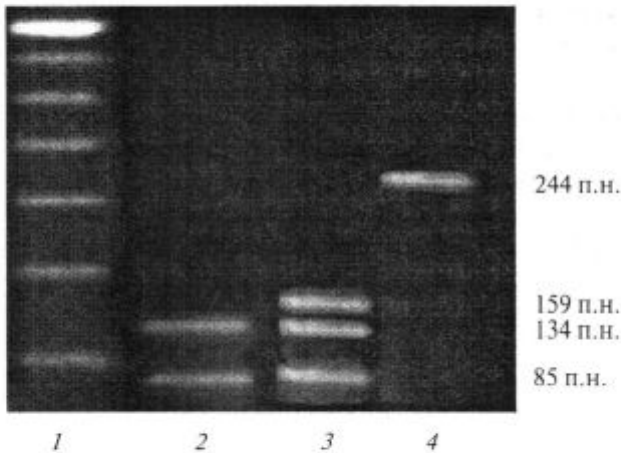


Рис. 1. Аналіз мутації 769 G → A гена *INHα1* в групі пацієнтів з передчасним виснаженням функції яєчників: 1 — маркер молекулярної маси (Ladder 100 bp), 2 — норма, 3 — мутація 769 G → A в гетерозиготному стані, 4 — нерестрикований фрагмент

пацієнтів з ПВЯ, яке може успадковуватися або по батьківській, або по материнській лінії, за аутосомально-рецесивним або Х-зчепленим домінантним типом наслідування з неповною пенетрантністю.

Були описані і порушення хромосом, які в основному спостерігали на Х-хромосомі. Вважається, що порушення на Х-хромосомі можуть викликати або повну делецію, або порушення окремих генів, важливих для процесу репродукції. Також ці дефекти можуть порушувати процес інактивації або опосередковано діяти на спарювання хромосом під час мейозу. Скоріше за все порушення, локалізовані на довгому плечі (Хq) Х-хромосоми, призводять до порушення функції яєчників, оскільки відомо, що порушення, локалізовані на короткому плечі Х-хромосоми (Хр), призводять до аномалій фізичного розвитку [3].

Нещодавно було встановлено, що ймовірними генами-кандидатами патогенезу ПВЯ є гени інгібіну альфа, зокрема ген *INH α1*, який кодує субодиницю α1 білка інгібіну. Цей ген локалізований в хромосомній ділянці 2q33. В 2-му екзоні цього гена було ідентифіковано мутацію 769G → A.

Синдром ламкої Х-хромосоми є досить розповсюдженою причиною розумової відсталості у чоловіків і жінок, це захворювання спричинено експансією (різким збільшенням) тринуклеотидних CGG-повторів в першому екзоні гена

FMRI (Хq27.3). У хворих індивідів, які мають повну мутацію, кількість повторів перевищує 200, а здорові носії премутації (жінки) мають 50–200 CGG-повторів; здорові індивіди повинні мати менше 50 повторів. Також було встановлено, що премутація гена *FMRI* синдрому ламкої Х-хромосоми частіше зустрічається у жінок з ПВЯ, ніж у здорового населення. Чому носії саме премутації, а не повної мутації мають ризик ПВЯ, залишається загадкою. Вважають, що експансія CGG-повторів на рівні премутації певним чином впливає на транскрипцію гена *FMRI* в яєчниках ембріона, в результаті чого носії премутації мають значно меншу кількість ооцитів вже при народженні. Це в свою чергу призводить до дисплазії в досить ранньому віці і в подальшому — до ПВЯ [7].

Генетичні дефекти і хромосомні порушення, що постійно виявляються у жінок з ПВЯ, наводять на думку, що у цих пацієнтів делетовані або порушені важливі гени. Такі знахідки допомагають ідентифікувати важливі генні регіони і є суттєвими для ідентифікації генів, важливих для репродуктивної функції. Це довело, що важко локалізувати відповідні гени згідно з генетичною різноманітністю і багатогранністю етіології, пов'язаної з ПВЯ. Крім того, ці порушення є досить рідкісними і звичайно не успадковуються, бо результатом їх є порушення репродуктивної функції. Тому клінічний і молекулярно-генетичний аналізи пацієнтів з ПВЯ та їх родин є дуже важливими для молекулярної ідентифікації цього складного захворювання.

Метою даного молекулярно-генетичного дослідження була розробка методів ДНК-аналізу мутації 769G → A гена *INH α1* та експансії CGG-повторів гена *FMRI* як основи створення тест-систем для діагностики генетично обумовлених форм ПВЯ.

Матеріали і методи. Матеріалами для дослідження мутації 769G → A в гені *INH α1* були зразки периферичної крові групи жінок-донорів яйцеклітин (контрольна група — 54 особи) та невеликої групи жінок з клінічним діагнозом ПВЯ (7 осіб). Матеріали були надані клінікою «ISIDA IVF».

ДНК виділяли загальновідомим методом фенольної екстракції з протеїназою К [8].

Для детекції послідовності гена *INHα* проводили ампліфікацію ДНК *in vitro* з використанням

ПЛР [9]. Послідовності праймерів були підібрані як гомологічні послідовностям, фланкуючим 2-й екзон гена *INHα* [10]. Аналіз послідовності проводили з використанням BLAST SEARCH.

ПЛР проводили в автоматичному режимі на термоциклері «Perkin Elmer GeneAmp PCR system 2400» за наступною схемою: денатурація ДНК — 40 с при 94 °С, відпалювання праймерів — 45 с при 55 °С, елонгація — 1 хв при 71 °С.

Реакційна суміш для ПЛР об'ємом 15–25 мкл містила: трис-НСІ — 67 мМ (рН 8,8 при 25 °С); $(\text{NH}_4\text{O})_2\text{SO}_4$ — 16,7 мМ; ЕДТА — 6,7 мкМ; MgCl_2 2,5–4 мМ; бичачий сироватковий альбумін — 170 мкг/мл; бета-меркаптоетанол — 10 мМ; dNTP — 400 мкМ кожного типу; ДНК — 1 мкг; термостабільна ДНК-полімераза — 0,5 од. акт.; олігонуклеотидні праймери — по 1 нг кожного.

Для ідентифікації ендонуклеази рестрикції із сайтом впізнання, специфічним для послідовності мутації 769G → А, проводили аналіз з використанням програми Vector NTI Suite 6. За результатами була вибрана рестриктаза BstVII(Bbv1) з сайтом впізнання 5'...GCAGC(N)8...3'. Гідролітичне розщеплення проводили в реакційній суміші при температурі 55 °С протягом 2 год. Рестрикцію цих фрагментів аналізували після електрофоретичного фракціонування в 8%-ному поліакриламідному неденатуруючому гелі протягом 2,5 год при 240 В. Візуалізацію рестрикованих фрагментів проводили після забарвлення бромистим етидіумом на УФ-транслюмінаторі.

Для аналізу кількості копій CGG-повторів гена FMR1 проводили ампліфікацію ДНК in vitro з

використанням ПЛР. Послідовності праймерів були підібрані як гомологічні послідовностям, фланкуючим ділянки CGG-повторів з промоторної послідовності. Аналіз послідовності проводили з використанням BLAST SEARCH.

ПЛР проводили в автоматичному режимі на термоциклері «Perkin Elmer GeneAmp PCR system 2400» за наступною схемою: парний цикл 96 °С — 6 хв, 5 циклів 96 °С — 50 с, 68 °С — 1 хв, 70 °С — 2–5 хв; 30 циклів 95 °С — 50 с, 72 °С — 1,5 хв.

Реакційна суміш для ПЛР включала: PCR Gold Buffer — 1×; MgCl_2 (Ampli Taq gold) — 2,5–4 мМ; dNTP(3:1) — dATP, dCTP, dTTP, 150 мкМ/л, 7-deaza-dGTP и 50 мкМ/л dGTP; DMSO (диметилсульфоксид) — 100 %; бичачий сироватковий альбумін — 170 мкг/мл; Ampli Taq Gold ДНК-полімераза — 0,5 од. акт. на пробу; Betain — 1 мкМ/мл; ДНК — приблизно 1 мкг; олігонуклеотидні праймери — 1 нг.

Один з праймерів FraX 1 мічений флуоресцентною міткою Cy5.

Детекцію продуктів ПЛР проводили на автоматичному лазерному флуориметрі ALF Express в денатуруючому 7%-ному поліакриламідному гелі. Після сканування ALF-гель обробляли програмою FM 2.1 (Fragment Manager Software V 2.1, Pharmacia).

Результати досліджень та їх обговорення. Аналіз мутацій 769G→А гена *INHα1* проводили в контрольній групі жінок-донорів яйцеклітин (54 особи) та невеликій групі жінок з клінічним діагнозом ПВЯ (7 осіб). Приклад аналізу мутації 769G → А наведено на рис. 1. У випадку мутації

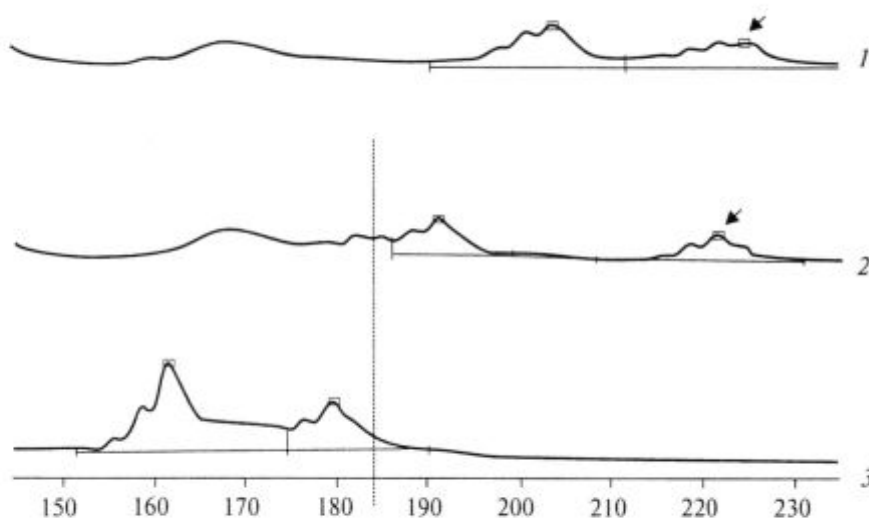


Рис. 2. Тестування жінок на носійство мутації в ділянці CGG-повторів гена FMR1: 1 — індивід з аелями 38 та 45 CGG-повторів (зона ризику), 2 — індивід з аелями 34 та 44 CGG-повторів (зона ризику), 3 — індивід з аелями 24 та 30 CGG-повторів (норма)

зникає один із сайтів впізнавання, тому в гетерозиготному стані ми спостерігаємо на електрофореграмі рестрикційні фрагменти довжиною 25, 85, 134 та 159 п.н. У випадку гомозигот за мутацією 769G → А можна спостерігати фрагменти довжиною 85 та 159 п.н. У разі відсутності мутації «дикий тип» після рестрикційного аналізу спостерігали фрагменти 85, 25 та 134 п.н.

За результатами проведеного аналізу нами були виявлені три особи-гетерозиготи за мутацією 769G → А. Таким чином, частота мутації 769G → А в популяції жінок України за попередніми розрахунками становить 2,8 %. Серед проаналізованих жінок з клінічним діагнозом ПВЯ (7 осіб) носіїв мутації 769G → А виявлено не було. Дослідження тривають, і на даному етапі проводиться поповнення банку ДНК жінок з клінічним діагнозом ПВЯ.

Аналіз алельного поліморфізму кількості CGG-повторів гена FMR1 проводили в групі жінок-донорів яйцеклітин (215 осіб). Приклад аналізу цієї послідовності наведено на рис. 2. Серед цієї групи жінок були виявлені чотири особи, які мали кількість CGG-повторів, що перевищує норму 42 повтори (розмір продукту ампліфікації 215 п.н.). В одному випадку було виявлено алель з премутацією 57 повторів — 260 п.н. Таким чином, частота осіб з алелями високого ризику премутації в гені FMR1 сягає 2,3 %. Жінкам з виявленими алельними варіантами, що входили в зону ризику, було рекомендовано медико-генетичне тестування та пренатальна діагностика синдрому дамкої X-хромосоми (тяжка розумова відсталість зустрічається 1 : 1500 хлопчиків і 1 : 2500 дівчаток) [11]. Результати нашого дослідження свідчать про актуальність генетичного тестування всіх жінок репродуктивного віку і, зокрема, донорів яйцеклітин з метою запобігання народження дітей, хворих на синдром дамкої X-хромосоми. Оскільки було встановлено асоціацію між ПВЯ та носійством премутації в гені FMR1, молекулярно-генетичне дослідження експансії CGG-повторів у жінок з клінічними ознаками ПВЯ може надати важливу інформацію про спадкову природу цього захворювання [5].

Розробка молекулярно-генетичних методів тестування мутацій, що спричиняють ПВЯ, дозволить значно поліпшити медико-генетичне консультування та планування сім'ї в групі жінок високого ризику та планування сім'ї в молодому

віці. Крім того, результати генетичного тестування дозволять вирішити питання про необхідність використання донорських яйцеклітин та проведення запліднення *in vitro*.

Автори вдячні співробітникам клініки «ISIDA IVF» за надання зразків крові та клінічної інформації, а також за фінансову підтримку дослідження.

SUMMARY. Methods of DNA-analysis of 769G→A mutations in INHα1 gene and CGG-repeats polymorphism in FMR1 gene have been developed for creating test-systems for genetically caused forms of premature ovarian failure (POF) diagnostics. The frequency of 769G → A mutation among women population in Ukraine was established and, by preliminary calculations, makes up 2,8 %. Results of analysis of CGG-repeats numbers in FMR1 gene in the group of 215 women (oocyte donors) revealed five persons with CGG-repeats numbers, that exceeds the normal one (42 copies). Thus the frequency of persons with alleles with high risk of pre-mutation in FMR1 gene is 2,3 %. The results of our research confirm the actuality of genetic tests of mutations in INHα1 and FMR1 genes among the women of reproductive age with the purpose of POF prognosis and prevention the birth of children with fragile X syndrome.

РЕЗЮМЕ. Разработаны методы ДНК-анализа мутации 769G→A гена INHα1 и полиморфизма количества CGG-повторов гена FMR1 для создания тест-систем по диагностике генетически обусловленных форм преждевременного истощения яичников. Установлено, что частота мутации 769G → А в популяции женщин Украины по предварительным расчетам составляет 2,8 %. По результатам анализа алельного полиморфизма количества CGG-повторов гена FMR1 в группе женщин-доноров яйцеклеток (215 индивидов) выявлено 5 индивидов, которые имели количество CGG-повторов, превышающее норму (42 копии). Таким образом, частота индивидов с алелями высокого риска премутации в гене FMR1 составляет 2,3 %. Результаты нашего исследования свидетельствуют об актуальности генетического тестирования мутаций генов INHα1 и FMR1 у всех женщин репродуктивного возраста с целью прогноза преждевременного истощения яичников и предотвращения рождения детей, больных синдромом ломкой X-хромосомы.

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. *Coulam C.B., Adamson S.C., Annegers J.F.* Incidence of premature ovarian failure // *Obstet. Gynecol.* — 1986. — 67. — P. 604—606.
2. *Conway G.S.* Premature ovarian failure // *Curr. Opin. Obstet. Gynecol.* — 1997. — 9(3). — P. 202—206.
3. *Anasti J.N.* Premature ovarian failure: an update // *Fertil. and Steril.* — 1998. — 70(1). — P. 1—15.
4. *Kalantardou S.N., Davis S.R., Nelson L.M.* Premature

- ovarian failure // *Endocrinol Metab. Clin. North. Amer.* — 1998. — **27**. — P. 989—1006.
5. *Shelling A.N.* X chromosom defects and premature ovarian failure // *Aust. N. Z. J. Med.* — 2000. — **30**. — P. 5—7.
 6. *Cramer D.W., Xu H.J., Harlow B.L.* Family history as a predictor of early menopause // *Fertil. and Steril.* — 1995. — **64**. — P. 740—745.
 7. *Fitch N., Saint V. der J., Richer C.L., Pinsky L., Sitahal S.* Premature menopause due to a small deletion in the long arm of the X chromosome: a report of three cases and a review // *Amer. J. Obstet. Gynecol.* — 1982. — **142**, № 8. — P. 968—972.
 8. *Mathew C.C.* The isolation of high molecular weight eucariotic DNA // *Method in molecular biology* / Ed. J. M. Walker. — New York; London : Human Press, 1984. — **2**. — P. 31—34.
 9. *Saiki R. K., Gelfand D. H., Stoffel S. et al.* Primer directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase // *Science.* — 1988. — **239**, № 8580. — P. 478—491.
 10. *Marozzi A., Porta C., Vegetti W., Crosignani P.G., Tobiletti M.G., Dalpra L., Ginelli E.* Mutation analysis of the inhibin alpha gene in a cohort of Italian women affected by ovarian failure // *Hum. Reprod.* — 2002. — **17**(7). — P. 1741—1745.
 11. *Webb T.P., Bunday S.E., Thake A.I., Todd J.* Population incidence and segregation ratios in the Martin-Bell syndrome // *Amer. J. Med. Genet.* — 1986 — **23**. — P. 573—580.

Надійшла 23.12.04