

СТВОРЕННЯ ТА ВПРОВАДЖЕННЯ В МЕДИЧНУ ПРАКТИКУ ТЕСТ-СИСТЕМ ДЛЯ ГЕННОЇ ДІАГНОСТИКИ ТЯЖКИХ СПАДКОВИХ ЗАХВОРЮВАНЬ

Л. А. Лівшиць, В. М. Пампуха, О. А. Ясінська, Г. Б. Лівшиць,
Н. В. Грищенко, С. А. Кравченко, М. В. Нечипоренко, Г. В. Єльська
Інститут молекулярної біології і генетики НАН України, Київ

Надійшла до редакції 08.04.05

Резюме: Розроблені тест-системи та створені їх лабораторні зразки, основані на застосуванні ДНК-аналізу для діагностики найбільш поширених в Україні моногенних спадкових захворювань таких як, муковісцидоз, спадковий гемохроматоз, синдром Мартіна-Бела (ламкої Х-хромосоми) та генетично обумовлених форм чоловічого безпліддя. Розроблені тест-системи можуть застосовуватись в спеціалізованих медико-генетичних, педіатричних закладах, центрах з планування родини та клініках, які застосовують допоміжні репродуктивні технології.

Ключові слова: мутації, муковісцидоз, спадковий гемохроматоз, синдром ламкої Х-хромосоми, фактор азооспермії, ДНК-діагностика, ПЛР.

Л. А. Лившиц, В. М. Пампуха, О. А. Ясинская, А. Б. Лившиц, Н. В. Грищенко, С. А. Кравченко, М. В. Нечипоренко, А. В. Ельская. СОЗДАНИЕ И ВНЕДРЕНИЕ В МЕДИЦИНСКУЮ ПРАКТИКУ ТЕСТ-СИСТЕМ ДЛЯ ГЕННОЙ ДИАГНОСТИКИ ТЯЖЕЛЫХ НАСЛЕДСТВЕННЫХ ЗАБОЛЕВАНИЙ.

Резюме: Разработаны тест-системы и созданы их лабораторные образцы, основанные на использовании ДНК-анализа для диагностики наиболее распространенных в Украине моногенных наследственных заболеваний таких как, муковисцидоз, наследственный гемохроматоз, синдром Мартина-Белла (ломкой Х-хромосомы) и генетически обусловленных форм мужского бесплодия. Разработанные тест-системы могут применяться в специализированных медико-генетических, педиатрических заведениях, центрах по планированию семей и клиниках, которые применяют вспомогательные репродуктивные технологии.

Ключевые слова: мутации, муковисцидоз, наследственный гемохроматоз, синдром ломкой Х-хромосомы, фактор азооспермии, ДНК-диагностика, ПЦР.

L. A. Livshits, V. M. Pampukha, O. A. Yasinska, G. B. Livshits, N. V. Hryshchenko, S. A. Kravchenko, M. V. Nechiporenko, G. V. Elska. CREATION AND APPLICATION OF TEST-KITS FOR SEVERE HEREDITARY DISEASES GENE DIAGNOSTICS TO MEDICAL PRACTICE.

Abstract: Test-systems and their exhibition working samples based on the DNA-analysis for diagnosis most spread in Ukraine monogenic hereditary disorders such as: cystic fibrosis, hereditary chromatosis, Martin-Bell syndrome (fragile X), genetic forms of male infertility were elaborated. The elaborated test-systems would be used in special medical centers for medical genetics, pediatric and in IVF clinics, which apply assessment reproductive technologies.

Keywords: mutations, cystic fibrosis, hereditary chromatosis, Martin-Bell syndrome (fragile X), azoospermia factor, DNA-diagnosis, PCR.

Результати проведених нами досліджень природи, спектру та розповсюдженості мутацій, які призводять до розвитку муковісцидозу, спадкового гемохроматозу, синдрому ламкої Х-хромосоми, факторів азооспермії, проведені серед населення різних регіонів України, дозволили встановити специфічність спектру мажорних мутацій, що локалізуються в різних екзонах гена ТРБМ, 2-му та 4-му екзонах гена HFEI, в ділянці FRAXA гена FMR1, в ділянці AZFc фактора азооспермії [1–4]. Отримані результати стали підґрунтям для розробки методів ДНК-діагностики мутантних генів в родинях високого ризику та при проведенні селективного і масового скринінгу населення з метою профілактики та прецизійного ефективного лікування цих тяжких спадкових захворювань. Метою проекту була розробка діагностичних методик ДНК-аналізу мутацій в різних екзонах гена ТРБМ (муковісцидоза), 2-му та 4-му екзонах гена HFEI, в ділянці FRAXA гена FMR1, в ділянці AZFc фактора азооспермії та створення готових до впровадження діючих лабораторних зразків ампліфікаційних тест-систем, для використання в спеціалізованих медико-генетичних центрах та дитячих лікарнях з метою пре- і постнатальної діагностики, уточнення діагнозу, медико-генетичного консультування родин високого ризику та проведення масового і селективного скринінгу носіїв мажорних мутацій вище означених генів.

В ході даної розробки були поставлені та вирішені наступні задачі:

- 1) Оптимізація методу виділення та очищення препаратів геномної ДНК з біологічних тканин людини (лейкоцитів периферійної крові, біоптатів хоріона, плаценти). Створення колекції зразків ДНК з мутантними і нормальними варіантами.
- 2) Розробка дизайну (нуклеотидної послідовності) праймерів для ампліфікації ДНК *in vitro* в 2-му, 3-му, 4-му, 7-му,

10-му, 11-му, 20-му, 21-му екзонах та в 2-му, 3-му, 4-му і 10-му інтронах гена трансмембранного регуляторного білку муковісцидозу (ТРБМ), 2-му та 4-му екзонах гена HFEI, в ділянці FRAXA гена FMR1, локусів: sY240, sY146, sY254, sY255, sY158 (AZFc). Синтез олігонуклеотидів відповідних послідовностей.

- 3) Розробка і оптимізація складу реакційної суміші та температурно-часових режимів для проведення полімеразної ланцюгової реакції з метою специфічної ампліфікації *in vitro* наступних послідовностей ДНК: 2-й, 3-й, 4-й, 7-й, 10-й, 11-й, 20-й, 21-й екзони та 2-й, 3-й, 4-й і 10-й інтрони (ген ТРБМ), 2-й та 4-й екзони гена HFEI, в ділянці FRAXA гена FMR1, локусів: sY240, sY146, sY254, sY255, sY158 (AZFc).
- 4) Підбір ендонуклеаз рестрикції із сайтами впізнавання, специфічними для послідовностей 1717-1G, R553X, G551D, R117H, 621+1G→T, R334, R347, N1303K, G542X, 1154insTC, 1717-1GaA, S5491, 1677delTA (ген ТРБМ) та C282Y, H63D (ген HFEI).
- 5) Відпрацювання та оптимізація складу реакційної суміші для проведення специфічної рестрикції.
- 6) Відпрацювання та оптимізація температурно-часових режимів для проведення специфічної рестрикції.
- 7) Розробка методів детекції ампліконів з використанням електрофоретичного фракціювання в поліакриламідному та агарозному гелях.
- 8) Розробка робочих діагностичних методик та лабораторних зразків тест-систем.

СТВОРЕННЯ КОЛЕКЦІЇ ЗРАЗКІВ ДНК З МУТАНТНИМИ І НОРМАЛЬНИМИ ВАРІАНТАМИ

Для виділення препаратів геномної ДНК з біологічних матеріалів людини (лейкоцити,

біоптати хоріону, плаценти, клітини амніотичної рідини та букального епітелію) зазвичай використовують депротейнізацію лізатів клітин з використанням протеїнази К та очищення препаратів ДНК фенол-хлороформною екстракцією з наступним осадженням етиловим спиртом [5]. Для виділення препаратів геномної ДНК із зразків свіжої крові, консервованої стандартним препаратом глюциром, нами проводився розділ лейкоцитарної і еритроцитарної маси за рахунок седиментації клітин в розчині, що містить 3,5 % желатину і 0,8 % NaCl. Після розшарування такого розчину у вузькому циліндрі відбирали верхній шар, що містить завесь лейкоцитів, промивали його 0,8 % NaCl рівним об'ємом і осаджували клітини центрифугуванням (3000 об/хв, 10 хвилин). Осад клітин ресуспендували в 2-х мл 0,8 % NaCl, додавали 2 мл 0,5 М ЕДТА (рН 8,0). Після цього лізували розчином додецилсульфату натрію (кінцева концентрація 1 %). Проводили виділення ДНК додаванням розчину перхлорату натрію до кінцевої концентрації 1,2 М. Очищення препарату ДНК проводили хлороформною екстракцією, осадження препарату ДНК проводили 0,6–0,8 об'ємами ізопропілового спирту.

Використаний метод дозволяє уникнути використання токсичної речовини – фенолу, що є суттєвим для охорони навколишнього середовища та охорони праці співробітників. Крім того, з процесу вилучено застосування коштовного препарату – протеїнази К, який не виробляється в Україні і є критичним імпортом.

Було створено банк лейкоцитарної ДНК хворих та членів їх родин, що налічує 50 зразків, з ідентифікованими мутаціями генів: ТРБМ, HFEI, FMR1 та AZF. Зразки ДНК створеного банку відповідають наступним генотипам:

1. ТРБМ – $\Delta F508/\Delta F508$; $\Delta F508/W$;
 $\Delta F508/CFTR\text{del}21\text{kb}$; $\Delta F508/1677\text{delTA}$;

$\Delta F508/G542X$; $\Delta F508/N1303K$;
 $N1303K/N1303K$; $1677\text{delTA}/W$;
 $CFTR\text{del}21\text{kb}/W$; $N1303K/W$; $W1282X/X$;
 $G542X/X$; $R117H/X$.

2. HFE – $H63D/W$; $H63D/H63D$;
 $H63D/C282Y$; $C282Y/W$; $C282Y/C282Y$.

3. FMR1 – зразки містять широкий спектр алельних варіантів з різною кількістю CGG-повторів (від 18 до 57 копій).

4. AZF – $\text{del } sY153, sY240, sY146, sY254$ (DAZ), $sY255$ (DAZ), $sY158$; $\text{del } sY240, sY146, sY254$ (DAZ); $\text{del } sY254$ (DAZ), $sY255$ (DAZ), $sY158$; $\text{del } sY117, sY124, sY134$.

Зразки ДНК зберігаються при температурі $-20\text{ }^\circ\text{C}$ і можуть бути використані як стандарти для контролю якості результатів діагностики відповідних спадкових захворювань.

РОЗРОБКА ДИЗАЙНА (НУКЛЕОТИДНОЇ ПОСЛІДОВНОСТІ) ПРАЙМЕРІВ

Проведено розробку дизайна (нуклеотидної послідовності) праймерів для ампліфікації ДНК *in vitro* в 2-му, 3-му, 4-му, 7-му, 10-му, 11-му, 20-му, 21-му екзонах та в 2-му, 3-му, 4-му і 10-му інтронах гена трансмембранного регуляторного білку муковісцидозу (ТРБМ), в 2-му та 4-му екзонах гена HFEI, в ділянці FRAXA гена FMR1, локусів: $sY240, sY146, sY254, sY255, sY158$ (AZFc). Аналіз послідовності праймерів на специфічність проводили з використанням комп'ютерної бази даних BLAST SEARCH за умов сканування геномної послідовності ДНК генів ТРБМ [6], HFEI [7], FMR1 [8], AZFc [9]. Основні вимоги до дизайну були наступні: висока специфічність з гомологією не менше ніж 90 %; якомога нижчий склад гуанідину в послідовності; однакові температури плавлення для

кожного з членів пари праймерів. За результатами аналізу були відібрані послідовності, які відповідають всім необхідним вимогам. Послідовності знаходяться в процесі патентування. З використанням твердофазного фосфоамедитного метода проведено синтез відповідних олігонуклеотидів, які можуть бути використані в якості праймерів, що входять до реакційної суміші, в тест-системах з ДНК-діагностики муковісцидоза, спадкового гемохроматоза, синдрому ламкої Х-хромосоми та факторів азооспермії.

РОЗРОБКА ТА ОПТИМІЗАЦІЯ СКЛАДУ РЕАКЦІЙНОЇ СУМІШІ ТА ТЕМПЕРАТУРНО-ЧАСОВИХ РЕЖИМІВ ДЛЯ ПРОВЕДЕННЯ СПЕЦИФІЧНОЇ ПОЛІМЕРАЗНОЇ ЛАНЦЮГОВОЇ РЕАКЦІЇ

Оптимальні умови проведення полімеразної ланцюгової реакції – склад реакційної суміші та температурно-часовий режим дозволяють отримати достатню для детекції кількість високо специфічного продукту ампліфікації ДНК *in vitro*. З метою створення таких умов проведення реакції нами проводився аналіз послідовностей ДНК-матриць для ПЛР та відповідних фланкуючих праймерів. Критичними параметрами для реакційної суміші були: концентрація іонів магнію, кількість ферменту – термостабільної Taq-полімерази та концентрація праймерів. Критичними вимогами до температурних режимів була: температура відпалення праймерів на ДНК-матриці та температура синтезу. Вимоги до часових режимів були наступними: співвідношення періоду денатурації до періоду відпалення праймерів та оптимальний час фази синтезу, а також загальна кількість повних циклів реакції. В результаті дослідження цих параметрів були зроблені відповідні температурно-часові режими.

НАУКА ТА ІННОВАЦІЇ. № 3, 2005

ПІДБІР СПЕЦИФІЧНИХ ЕНДОНУКЛЕАЗ РЕСТРИКЦІЇ З САЙТАМИ ПІЗНАВАННЯ ПОСЛІДОВНОСТЕЙ МУТАЦІЙ ГЕНА ТРБМ ТА ГЕНА НФЕІ

Для детекції мононуклеотидних замін, які мають місце у випадку мутацій (N1303K, R117H, 1717-1G>A (ген ТРБМ) та С282У, Н63D (ген НФЕІ)) використовували метод аналізу поліморфізму довжини рестрикційних фрагментів (ПДРФ). З цією метою необхідно було підібрати ендонуклеази рестрикції, які б специфічно гідролізували мутантні та нормальні послідовності гена ТРБМ та гена НФЕІ. Для аналізу таких ендонуклеаз рестрикції нами була використана програма Vector NTI Suite 6. Реакційна суміш для проведення рестрикції була оптимізована таким чином, що рестрикцію можна було проводити безпосередньо в буфері ампліфікації, що дозволяло уникнути додаткової стадії виділення та очищення ампліфікованих фрагментів ДНК. В результаті проведеного аналізу були підібрані необхідні ендонуклеази рестрикції та відповідні температурно-часові режими для реакції гідролізу цими ендонуклеазами.

ВІДПРАЦЮВАННЯ УМОВ ЕЛЕКТРОФОРЕТИЧНОГО ФРАКЦІОНУВАННЯ

Електрофоретичне фракціонування дозволяє проводити візуалізацію та визначення специфічних продуктів ПЛР. Умови проведення цього фракціонування в кожному випадку повинні вирішувати задачу максимального розділення різних за молекулярною масою продуктів ПЛР за мінімальний час. З цією метою нами було проведено дослідження агарозних та поліакріламідних гелів різних концентрацій. Також відпрацьовувались розміри гелів, параметри сили струму та напруги, час про-

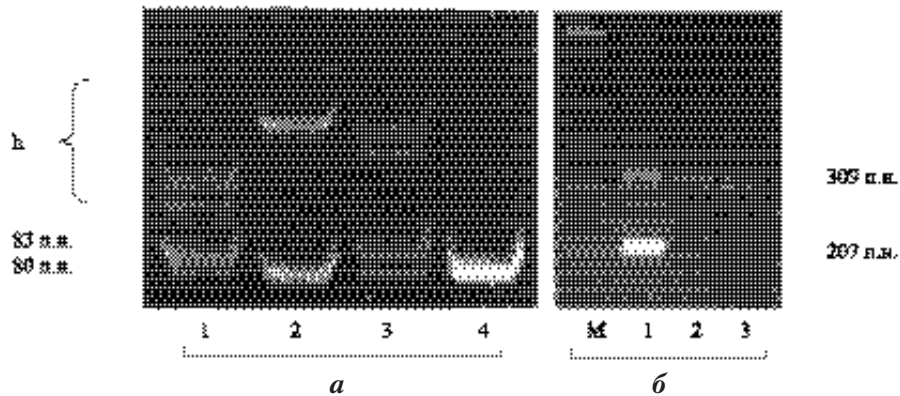


Рис. 1. Аналіз мутацій гена ТРБМ: а) в 10-му екзоні, 12 %-й ПААГ: 1 – гетерозиготний носій делеції 1677delTA; 2 – індивід із генотипом 1677delTA/delF508; 3 – гетерозиготний носій делеції delF508; 4 – індивід із генотипом delF508/delF508; б) протяжної делеції CFTRdele2,3(2,1 kb), 1,8 %-вий агарозний гель: М – маркер молекулярної маси (Ladder 100 bp, Pharmacia); 1 – носій мутації; 2, 3 – здорові індивіди

ведення фракціювання. За результатами дослідження були розроблені відповідні режими для детекції кожної з досліджуваних мутацій.

Розроблено супровідну документацію у вигляді протоколів робочої діагностичної методики для ДНК-аналізу мутацій при муковісцидозі, спадковому гемохроматозі, синдромі ламкої Х-хромосоми, факторах азооспермії.

ЗАГАЛЬНІ ХАРАКТЕРИСТИКИ ТЕСТ-СИСТЕМ

В ході виконання проекту були розроблені тест-системи та створені їх лабораторні зразки, основані на застосуванні ДНК-аналізу для діагностики найбільш поширених в Україні моногенних спадкових захворювань таких як, муковісцидоз, спадковий гемохроматоз, синдром Мартіна-Бела (ламкої Х-хромосоми) та генетично обумовлених форм чоловічого безпліддя. Дані тест-системи дозволяють не тільки проводити діагностику цілого ряду найбільш розповсюджених спадкових патологій, але й стануть основою системи

вторинної профілактики найбільш розповсюджених тяжких захворювань в родинах високого ризику завдяки можливості проведення пренатальної діагностики на ранніх термінах вагітності та організації програм добровільного генетичного тестування гетерозиготних носіїв мутантних генів.

1. Розроблена тест-система для ДНК-діагностики наступних найбільш розповсюджених в Україні мутацій гена ТРБМ: delF508, delF507, CFTR2, 3del21kb, 1717-1G, R553X, G551D, R117H, 621+1G→T, R334W, R347, N1303K, G542X, 1154insTC, 1717-1GaA, S5491, 1677delTA. На рис. 1 наведено приклад аналізу деяких мутацій. Тест-система може бути використана в клінічній (постнатальне уточнення діагнозу), в пренатальній (з першого триместру вагітності) діагностиці МВ та для виявлення гетерозиготних носіїв а – в родинах високого ризику, б – в програмах добровільного генетичного тестування населення.

2. Розроблена тест-система для ДНК-діагностики найбільш поширених мутацій С282У і Н63D в гені HFE-1. На рис. 2 наведено приклад аналізу деяких мутацій. Тест-сис-

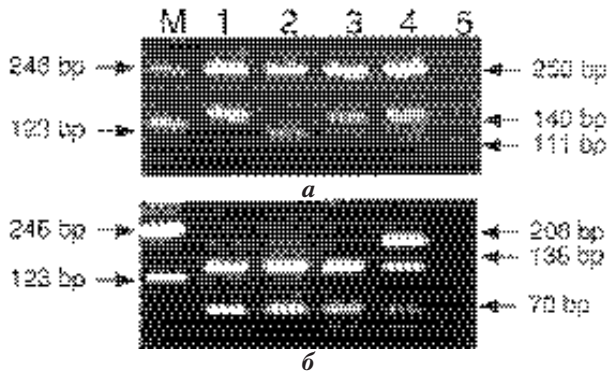


Рис. 2. а) Визначення мутації С282У методом ПЛР/ПДРФ. 2 %-ий агарозний гель. Розчеплення продуктів ПЛР ензимом рестрикції Rsa 1: М – маркер молекулярної маси (Ladder 123 bp); 1 – здоровий індивід; 2 – гомозигота за наявністю мутації; 3–4 – гетерозиготні носії мутації; 5 – негативний контроль ПЛР); б) Визначення мутації Н63D методом ПЛР/ПДРФ. 2 %-ий агарозний гель. Розчеплення продуктів ПЛР ензимом рестрикції Vcl 1: М – маркер молекулярної маси (Ladder 123 bp); 1, 2, 3 – індивіди без мутації; 4 – гетерозиготний носій мутації; 5 – негативний контроль ПЛР

тема може бути використана для уточнення клінічного діагнозу у хворих на гемохроматоз, ідеопатичні панкреатити, гепатити, ци-

роз печінки, цукровий діабет, кардіоміопатії та деякі онкологічні захворювання з метою вибору тактики лікування, а також для виявлення мутантного гена в програмах добровільного генетичного тестування населення.

3. Розроблена тест-система для ідентифікації алелів з кількістю CGG повторів в гені FMR1, що відповідають премутації (~ 50 CGG повторів) та алелів високого ризику, які експансуються до розміру премутації за одне покоління (~ 40 CGG повторів). На рис. 3 наведено результати аналізу CGG повторів гена FMR1. Тест-система може бути використана для виявлення гетерозиготних носіїв премутації та алелів "високого ризику" у родичів жіночої статі хворих з синдромом Мартіна-Бела та в програмах добровільного генетичного тестування жіночого населення.

4. Розроблена тест-система для ідентифікації мікроделеції в генах AZFa, AZFb та AZFc (ген DAZ) з використанням ДНК-аналізу в наступних STS локусах: sY84, sY85, USP9Y, sY117, sY124, sY134, sY141, sY153, sY240, sY146, sY254, sY255, sY158 та SRY. На рис. 4 наведено результати аналізу мікроделе-

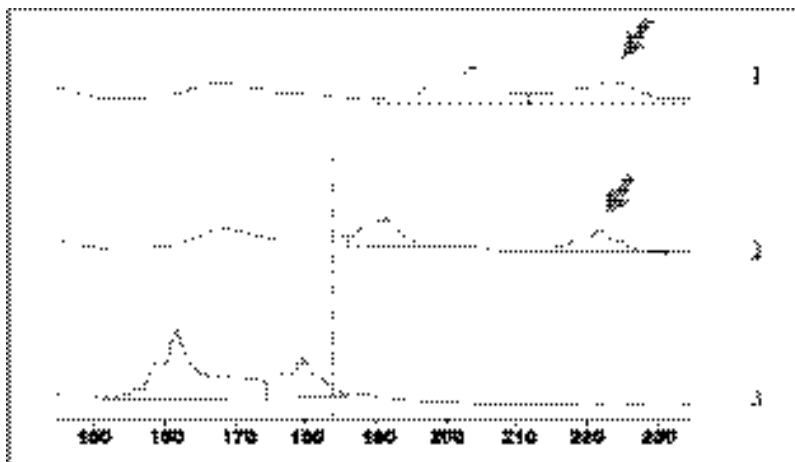


Рис. 3. Тестування жінок на носійство мутації в області CGG-повторів гена FMR1: 1 – індивід з алелями 38 та 45 CGG-повторів (зона ризику), 2 – індивід з алелями 34 та 44 CGG-повторів (зона ризику), 3 – індивід з алелями 24 та 30 CGG-повторів (норма)

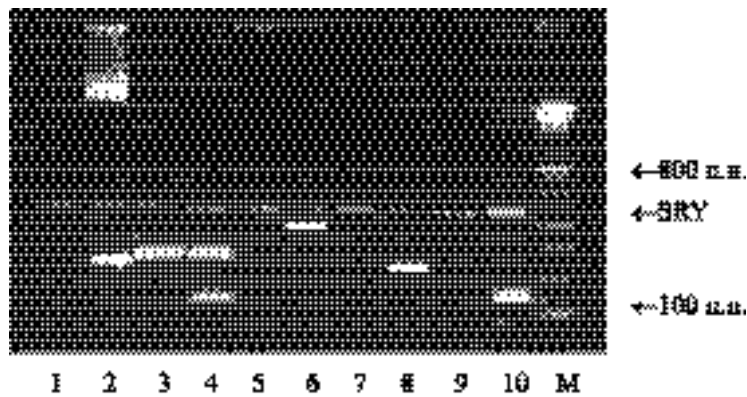


Рис. 4. Електрофореграма. Визначення мутацій мікроделецій довгого плеча Y-хромосоми (AZFc): 1 – делеція sY158; 2 – відсутність делеції sY158; 3 – делеція sY255 + відсутність делеції sY117 (AZFb); 4 – відсутність делеції sY255 і делеція sY117 (AZFb); 5 – делеція sY254; 6 – відсутність делеції sY254; 7 – делеція sY240; 8 – відсутність делеції sY240; 9 – делеція sY153; 10 – відсутність делеції sY153; M – маркер (Ladder 100 bp)

лецій з області AZFb і AZFc. Тест-система може бути використана для діагностики етіології у чоловіків із необструктивними формами безпліддя. Діагностика цих порушень є важливою для тактики лікування даних форм чоловічого безпліддя з використанням допоміжних репродуктивних технологій, а також необхідна для прогнозу потомства та попередження народження хлопчиків із тяжкими порушеннями сперматогенезу.

Пілотне виробництво тест-систем може бути організовано на базі Інституту молекулярної біології і генетики НАНУ. Масове виробництво для забезпечення потреб всіх регіонів України може бути розпочато за умови створення Центру з проблем молекулярної генетики та генних технологій на базі ІМБіГ НАНУ. Потенціальними інвесторами можуть стати вітчизняні підприємства, які спеціалізуються на випуску біомедичних тест-систем, наприклад, такі як "Стирол Біофарм", "Діапрофмед", БАТ та інші.

Перелік установ, в яких для клінічної діагностики 1100 пацієнтів з муковісцидозом,

синдромом Мартіна-Бела, генетично обумовленими формами чоловічого безпліддя, спадковим гемохроматозом та пов'язаних з ним вторинними патологіями було застосовано розроблені методи ДНК-аналізу: Інститут педіатрії, акушерства та гінекології АМН України, Науковий центр радіаційної медицини АМНУ, Інститут нейрохірургії АНМУ, Інститут медицини праці АМНУ, Інститут очних хвороб і тканинної терапії ім. В. П. Філатова АМНУ, Інститут спадкової патології АМН України (м. Львів), Кримський республіканський центр медичної генетики та репродукції людини (м. Симферополь), Український центр діагностики та лікування муковісцидозу (м. Одеса), Міжобласні медико-генетичні центри: Київський, Донецький, Харківський, Одеський, Криворізький; обласні медико-генетичні консультації: Тернопільська, Рівненська, Полтавська, Хмельницька, Вінницька, Волинська, Івано-Франківська, Чернігівська, Закарпатська, Луганська; клініка "Ісіда-IVF" (м. Київ). За матеріалами розробки проводиться оформлення патентів на винахід.

ЛІТЕРАТУРА

1. **Лівшиць Л. А., Малярчук С. Г., Екшиян О. Ю., Кравченко С. А., Нечипоренко М. В., Пампуха В. М., Бичкова А. М., Михайлець Л. П., Афанасьєва Н. О., Сопко Н. І., Баріляк І. Р.** Генетика і селекція в Україні на межі тисячоліть у чотирьох томах: Молекулярно-генетичні дослідження та ДНК-діагностика найбільш поширених в Україні спадкових захворювань моногенної природи // Київ, Логос, 2001.–т. 4.–С. 604–622.
2. **Лівшиць Л. А., Ясінська О. А.** Роль мікрodelецій хромосомної області Yq11 в розвитку необструктивних форм чоловічого безпліддя // Цитологія і генетика.–2002.–т. 36.–№ 5.–С. 73–78.
3. **Пампуха В. М., Розуменко В. Д., Черченко А. П., Лівшиць Л. А.** Аналіз мутацій С282У та Н63D гену спадкового гемохроматозу HFE серед населення України та хворих з гліальними пухлинами мозку // Біополимери и клетка.–2003.–т. 19.–№ 6.–С. 536–541.
4. **Грищенко Н. В., Малярчук С. Г., Экшиян А. Ю., Бычкова А. М., Лившиц Л. А.** Аналіз метилювання промоторної області гена FMR1 у больних с синдромом Мартина-Белла из Украины // Цитология и генетика.–2002.–т. 36.–№ 4.–С. 53–56.
5. **Маниатис Т., Фрич Е. Е., Сэмбрук Ж.** Молекулярное клонирование.–М.: Мир, 1985.–420 с.
6. **Kerem B., Rommens J. M., Buchanan J. A. et al.** Identification of the cystic fibrosis gene: genetic analysis // Science.–1989.–v. 245.–P. 1073–1080.
7. **Feder J. N., Gnirke A., Thomas W. et al.** A novel MHC class I-like gene is mutated in patients with hereditary haemochromatosis // Nature Genet.–1996.–13.–P. 399–408.
8. **Webb T. P., Bunday S. E., Thake A. I., Todd J.** Population incidence and segregation ratios in the Martin-Bell syndrome // Am. J. Med. Genet.–1986.–v. 23.–P. 573–580.
9. **Tiepolo L., Zuffardi O.** Localization of factors controlling spermatogenesis in the nonfluorescent portion of the human Y chromosome long arm // Hum. Genet.–1976.–v. 34.–P. 119–124.