

- stem cells and multipotent adult progenitor cells // *Immunol. Cell Biol.* – 2013. – Vol. 91, №1. – P. 32–39.
3. Фрешни Р.Я. Культура животных клеток: практическое руководство. – М.: Бином. Лаборатория знаний, 2010. – 691 с.
 4. Лукаш Л.Л., Яцишина А.П., Кушнирук В.О., Пидпала О.В. Репрограммирование соматических клеток взрослого человека *in vitro* // Фактори експериментальної еволюції організмів. – К: Логос, 2011. – Т. 11. – С. 493–498.
 5. Кушнирук В.О., Кочубей Т.П., Мацевич Л.Л., Рубан Т.П., Лукаш Л.Л. Дослідження каріотипу нової лінії клітин людини 4BL6 при тривалому культивуванні *in vitro* // Фактори експериментальної еволюції організмів. – К: Логос, 2012. – Т. 3. – С. 313–318.
 6. Morange M. The scientific legacy of Jacques Monod // *Research in Microbiology.* – 2010. – Vol. 161. – P. 77–81 p.

KUSHNIRUK V.O., RUBAN T.P., LUKASH L.L.

Institute of Molecular Biology and Genetics of NAS of Ukraine

Ukraine, 03680, Kyiv, Zabolotnogo str., 150, e-mail: kushniruk_v_o@ukr.net

MORPHOLOGICAL AND GROWTH PECULIARITIES OF NEW HUMAN CELL LINE 4BL

Morphology of cells and growth curve are important characteristics of cell line, so the *aim* of this research was to study these peculiarities. **Methods.** We investigated original cell line 4BL, obtained from peripheral blood of healthy donor, which was successfully passed through the Heyflick limit. Methods of cell cultivation and standard cytological methods were used. **Results.** Cell line 4BL and its clones consist of two main types of cells: fibroblast-like and epithelioid. Cells have non-random distribution on the surface of culture dish and form cycle-like structures. These properties indirectly denote about stem potential of these cells, what have been confirmed by special investigations. Growth curves had graded character: virtually absence of lag-phase, two periods of exponential growth with phase of growth impairment between them, virtually absence of stationary phase and two peaks with maximum quantity of cells and accordingly two-step decreasing. **Conclusions.** Fibroblast-like and epithelioid cells are two main morphological types of cell line 4BL, so as it's clones 1, 2 and 3. Ability to form cycle structures at the surface of culture dish was observed. Growth curves had graded character.

Key words: human cell line, growth curves, stem cells.

МАКУХ Г.В., ГНАТЕЙКО О.З.

ДУ «Інститут спадкової патології НАМН України»

Україна, 79008, Львів, вул. Лисенка, 31 а, e-mail: makukh.h@ihp.lviv.ua

РОЗРОБКА ПІДХОДІВ ДЛЯ ХАРАКТЕРИСТИКИ СЕГРЕГАЦІЙНОЇ СКЛАДОВОЇ ГЕНЕТИЧНОГО ТЯГАРЯ У ЛЮДИНИ

У популяціях людини накопичений тягар генетичної патології і значна частка інвалідизації припадає на спадкові хвороби, які спричинені мутаціями, що накопичені еволюційно [1]. Успадковані мутантні алелі генів, які є причиною розвитку хвороб людини, є сегрегаційною складовою генетичного тягаря [2] й одна з головних концепцій медичної генетики полягає у визнанні положення про їх еволюційне накопичення [3]. Це зумовлює актуальність вивчення спектру, розповсюдження, зв'язку з фенотипом різних алельних варіантів гена у кожній конкретній «крайовій» популяції, етнічній чи територіальній групі [4, 5].

Дослідження, проведені в окремих регіо-

нах України методами генетичного моніторингу, переважно фокусувалися на мутаційній складовій, разом з тим, вони показали й значну частку сегрегаційної складової генетичного тягаря. Єдиного підходу для обчислення сегрегаційної складової генетичного тягаря немає, проте дані про сегрегаційну складову генетичного тягаря є необхідними для проведення медико-генетичного консультування, розрахунку генетичного ризику, запровадження програм масового скринінгу та планування профілактичних заходів у системі охорони здоров'я населення. Мета роботи: розробити та запропонувати підходи для характеристики сегрегаційної складової генетичного тягаря.

Матеріали і методи

Використано банк ДНК жителів Західного регіону України, у якому зібрано понад 3000 взірців ДНК пацієнтів із різними нозологіями та здорових осіб. Проаналізовано частоту і спектр мутацій генів CFTR, HFE, NBN, SMN1, PAH та відповідних моногенних захворювань; розподіл

Результати та обговорення

Оскільки фенотипові наслідки сегрегаційного генетичного тягаря виявляються на різних етапах онтогенезу [6], для отримання об'єктивної характеристики цього показника слід розглянути біологічні моделі, які б виявляли його дію в різні періоди розвитку людини. Так, на ранніх етапах онтогенезу дія генетичного тягаря може спричинитися до загибелі ембріона і проявляється у вигляді самовільного абортів [7]. Нез'ясованими є питання ідентифікації локусів, які входять до генної сітки спадкових чинників, що збільшують ризик самовільного абортів; з урахуванням співвідношення материнського та генотипу плода. Проведено аналіз спектра і частоти окремих алельних варіантів генів фолатного обміну (MTHFR, MTR, MTRR), гемостазу (FV, FII, PAI-1), інсулін-подібного фактору росту – II (IGF2) у жінок з рецидивуючим мимовільним абортів і в генетичному матеріалі самовільно елімінованих ембріонів у порівнянні з відповідними контрольними групами. В результаті проведеного дослідження встановлено значуще підвищення ризику викидня при наявності у жінки наступних алелів і генотипів: MTR 2756AA – в 1,92 рази, IGF2 820GA – в 2,5 рази, MTRR 66AG і MTRR 66GG в порівнянні з генотипом MTRR 66AA - в 3,76 рази, мутації 1691G → A гена FV – в 3 рази, 4G алелі локусу 675 4G/5G гена PAI-1 – в 1,6 рази. Дослідження, проведені в генетичному матеріалі самовільно елімінованих ембріонів, показали, що наявність у ембріона генотипу MTHFR 677TT може збільшувати ризик мимовільного викидня в 7 разів, MTRR 66AG – в 4 рази, IGF2 820GA – у 8 разів.

У результаті проведених досліджень встановлено розподіл алелей і генотипів поліморфних локусів C677T і A1298C гена MTHFR, A2756G гена MTR, A66G гена MTRR, 675 5G/4G ins/del гена PAI-1, G1691A гена FV і G20210A гена FII, G820A гена IGF2 в загальній репрезентативній вибірці жителів Західного регіону України. Виявлено відповідність отриманих результатів розподілу генотипів рівновазі Харді-Вайнберга у всіх досліджуваних локусах.

Успадковані мутації найчастіше проявля-

ються фенотипово як рецесивні моногенні захворювання [8]. Відомо, що існують відмінності між популяціями та регіонами щодо частот аутосомно-рецесивних захворювань і спектра мутацій, що їх спричинюють [9]. Для встановлення внеску окремих нозологій та мутацій, які їх спричинюють, у структуру генетичного тягаря і визначення значення їхнього ризику для жителів Західноукраїнського регіону проведено дослідження мутацій генів найбільш частих аутосомно-рецесивних захворювань: HFE (зумовлює розвиток спадкового гемохроматозу), CFTR (муковісцидозу), SMN1 (спінальної аміотрофії), PAH (фенілкетонурія), NBN (синдрому Ніймеген).

Визначено, що серед загальної вибірки жителів Західної України 3,4 % є гетерозиготними носіями мажорних мутацій гена CFTR (муковісцидоз), 3,23 % – гена HFE (спадковий гемохроматоз), 1,7 % (2,7% – жителів Львівської області) – гена SMN1 (спінальна аміотрофія), 2,1 % – гена PAH (фенілкетонурія), 1,1 % – гена NBN (синдром Ніймеген) і мають ризик народження дітей з відповідними аутосомно-рецесивними захворюваннями.

Встановлено частоту і спектр алелів гена і запропоновано алгоритм молекулярно-генетичного тестування мутацій гена CFTR для практичної діагностики муковісцидозу та медико-генетичного консультування. Вперше виявлено, що у хворих на МВ з України другою за частотою є мутація 2184insA, інформативність якої становить понад 7 %. На основі виявленого спільного гаплотипу на хромосомах з цією мутацією підтверджена попередньо висунута нами гіпотеза про походження цієї мутації з Галичини.

Проведено молекулярно-генетичне дослідження мутацій гена SMN у пацієнтів з клінічними ознаками спінальної аміотрофії. Серед пробандів делеція 7-го екзонів гена SMN1 в гомозиготному стані виявлена у 55,4 % хворих СМА. Гомозиготну делецію 8-го екзонів гена SMN1 виявляли тільки в компаунді з делецією 7-го екзону, і це стосувалося 44,5 % обстежених

пацієнтів. Частота виявлення гомозиготних делецій 7 і 8-го екзонів гена SMN1 знижується з полегшенням клінічних проявів захворювання. Проведена молекулярно-генетична діагностика мажорної мутації R408W (с. 1222C>T) гена фенілаланінгідроксилази у хворих ФКУ і членів їх сімей та визначена частота мутації R408W в дослідженій групі пробандів, яка становить 62,9 %. Заперечено наявність мутацій R158Q і Y414C гена ФАГ у хворих ФКУ, у яких мажорна мутація R408W не виявлена або виявлена в гетерозиготному стані. Молекулярно-генетичний аналіз мутації 657del5 гена NBN дозволив виявити 35 випадків гомозиготного носійства мутації 657del5 і верифікувати синдром Ніймеген у 38 осіб. Визначено, що частота мутації 657del5 гена NBN у хворих синдромом Ніймеген становить 96,05 %.

Визначено показники ризику гетерозиготного носійства поширених мутацій генів CFTR, HFE, SMN1, PAH, NBN для використання в практиці медико-генетичного консультування мешканців Західної України. Молекулярно-генетичне дослідження дозволило провести коректну діагностику моногенних захворювань і виявити здорових гетерозиготних носіїв мутацій. ДНК-діагностика була застосована в пренатальних дослідженнях аутосомно-рецесивної патології як метод ефективної профілактики важкої інвалідизації та ранньої дитячої смертності.

Ще одним наслідком реалізації генетичного тягаря є непліддя, висока частота якого зумовлює порушення процесів природного відтворення чисельності популяції. Тому, інформативними можуть бути дані про генетичні чинники, що зумовлюють порушення сперматогенезу у чоловіків.

Молекулярно-генетичні дослідження генетичних факторів чоловічого непліддя проведені серед інфертильних чоловіків з ідіопатичними порушеннями сперматогенезу. Встановлено, що частота носійства мутацій гена CFTR в обстеженій групі безплідних чоловіків з порушеннями сперматогенезу вище в порівнянні з контрольною вибіркою. На прикладі спадкових мутацій гена CFTR проявляється подвійний негативний ефект сегрегаційної складової генетичного тягаря: підвищений ризик виникнення

моногенної спадкової патології (муковісцидоз) і порушення фертильності (ізолюване непліддя) у чоловіків. У неплідних чоловіків Західноукраїнського регіону мікроделеції регіону AZF Y-хромосоми є причиною 6,0% випадків ідіопатичного порушення сперматогенезу, у тому числі 15,3 % аспермії. У групі неплідних чоловіків проведено молекулярно-генетичне дослідження часткових делецій регіону AZFc і виявлено делеції типу gr/gr – у 3,43 %, b2/b3 – у 3,71 %, b1/b3 – у 0,29 % і відсутність локусу sY1201 – у 0,6 % чоловіків.

У чоловіків з частковими делеціями регіону AZFc поширеним був гаплотип R1a1 (28 %), при його повній відсутності у чоловіків без делецій, у 46 % яких встановлено гаплотип R1a1. У чоловіків Західноукраїнського регіону виявлено 19 різних гаплотипів Y-хромосоми. Частіше у чоловіків є Y-хромосоми, які відносяться до гаплотипів R1a1 (18 %), R1a1a (18 %) і I2a (19 %). Обчислення коефіцієнта додаткових шансів показало, що наявність гаплотипу R1a1 є фактором, що двадцятикратно збільшує ризик виникнення часткових делецій (ВШ=20,09, 95 % ДІ: 2,44–165,57, P=0,0004), а приналежність до гаплогрупи N-одиннадцятикратно (ВШ =11,05, 95 % ДІ: 1,21–101,2, P = 0,019). Доведено, що часткові делеції AZFc регіону є не тільки варіантом поліморфізму, але й значимим генетичним фактором порушення сперматогенезу у чоловіків. У носіїв R1a1 гаплотипу Y-хромосоми значно зростає ризик виникнення часткової делеції регіону AZFc типу gr/gr, у носіїв гаплогрупи N-виникнення часткових делецій типу b2/b3.

У результаті проведених досліджень отримано дані про розповсюдження та фенотипові асоціації окремих алелів та генотипів генів MTHFR, MTR, MTRR, FV, FII, PAI-1, IGF2, HFE, CFTR, SMN, PAH, NBN, AZF, гаплотипів Y-хромосоми серед жителів Західноукраїнського регіону. Охарактеризована частота, особливості спектра і фенотипові асоціації спадкових мутацій, які реалізуються на різних етапах онтогенезу людини у вигляді збільшення ризику мимовільного абортів, виникнення аутосомно-рецесивних захворювань і порушення фертильності та є сегрегаційною складовою генетичного тягаря.

Висновки

1. На прикладі жителів Західноукраїнського регіону розроблено та застосовано діагностичну модель для характеристики сегрегаційної складової генетичного тягаря.

2. Запропонований діагностичний підхід включає аналіз материнського та генотипу плода при самовільному аборті; вивчення частоти гетерозиготного носійства найбільш частих ау-

тосомно-рецесивних захворювань; аналіз генетичних чинників порушення сперматогенезу у чоловіків.

3. Застосування діагностичної моделі дає можливість виявляти негативні наслідки генети-

чного тягаря, які проявляються у вигляді хвороб людини й маніфестують на різних етапах онтогенезу та здійснювати ефективні профілактичні заходи.

Література

1. Genetics // World Health Organization [Електронний ресурс]: . – Режим доступу : <http://www.who.int/topics/genetics/en> (дата звернення: 20.02.2012).
2. Баранов В.С. Мутации. Классификация, номенклатура, механизмы воздействия, методы диагностики / В.С. Баранов, Т.Э. Ивашенко // Геномика – медицине. Научное издание. – М.: Академкнига, 2005. – С. 40–50.
3. Phelps F.M. IV. A model for the evolution of the genome: the effect of stochasticity on genetic loads // IMA J Math Appl Med Biol. – 1995. – Vol. 12 (1). – P. 1–11.
4. Кордюм В. А. Стан генофонду – формулювання критеріїв // Биополимеры и клетка. – 1993. – Т. 9, №2. – С. 80–111.
5. Гинтер Е.К. Медицинская генетика: учебник / Е.К. Гинтер. – М. : Медицина, 2003. – 448 с.
6. Harpending H., Cochran G. Genetic diversity and genetic burden in humans / H. Harpending, // Infect Genet Evol. – 2006. – Vol. 6, № 2. – P. 154–162.
7. Богатирьова Р.В., Гречанина О.Я. Генетика репродуктивних втрат: зб. наук. праць. – К. : Б.В., 2003. – 206 с.
8. Online Mendelian Inheritance in Man (OMIM) [Електронний ресурс] // The National Center for Biotechnology Information: [сайт]. – Режим доступу: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez?db=omim> (дата звернення: 02.03.12).
9. Балановский О.П., Кошель С.М., Запорожченко В.В. и др. Эколого-генетический мониторинг в популяциях человека: гетерозиготность, гаплотипическое разнообразие мтДНК и генетический груз // Генетика. – 2011. – Т. 47, №11. – С. 1523–1535.

МАКУКН Н.В, HNATEYKO O.Z.

«Institute of Hereditary Pathology of National Academy of Medical Sciences of Ukraine»
Ukraine, 79008, Lviv, Lysenko, 31, e-mail: makukh.h@ihp.lviv.ua

APPROACHES FOR THE DEFINING OF SEGREGATION PART OF GENETIC LOAD IN HUMAN

Aims. Evolutionary accumulated mutant alleles that cause human diseases are segregated part of the genetic load in human. One approach to estimate the segregation part of the genetic load in humans is not existed. The objectives of the study – to develop and propose the approaches for segregation component of genetic load characterizing. **Methods.** The data on the distribution of alleles and genotypes of MTHFR, MTR, MTRR, FV, FII, PAI-1, IGF2, HFE, CFTR, SMN, PAH, NBN AZF genes and Y-chromosome haplotypes among the inhabitants of the Western region of Ukraine have been composed and examined. **Results.** The segregated part of the genetic load was defined by establishing the distribution and characteristics of the spectrum of mutations that are phenotypy manifested at different stages of ontogenesis in the form of human diseases. It has been found that CFTR gene mutation 2184insA is the second most frequent allele among Cystic Fibrosis patients from Ukraine. It has been proved that AZFc partial deletions are not only a polymorphism variant but a genetic factor of men spermatogenesis disorders. It has been described the relationship between Y-chromosome haplotypes and AZFc region partial deletions: haplogroup N increases the risk of b2/b3 partial deletion, and the haplotype R1a1 increases the risk of gr/gr partial deletion. **Conclusions.** It has been developed and applied the diagnostic approach that includes an analysis of maternal and fetal genotype in case of spontaneous abortions, the study of the frequency of heterozygous carriers of the most common autosomal recessive diseases and the analysis of genetic factors of impaired spermatogenesis in men.

Key words: genetic load, mutation, human diseases, genetic testing.