

МУТАЦИЈЕ И ПОЛИМОРФИЗМИ У ГЕНУ *CFTR* КОД ИНФЕРТИЛНИХ МУШКАРАЦА С ОЛИГОСПЕРМИЈОМ ИЛИ АЗОСПЕРМИЈОМ

Јелена КУШИЋ¹, Драгица РАДОЈКОВИЋ¹, Винка МАЛЕТИЋ²,
Снежана БРАНКОВИЋ³, Ана САВИЋ¹

1. Институт за молекуларну генетику и генетичко инжењерство, Београд; 2. Уролошка клиника Клиничког центра Србије, Београд; 3. Институт за ментално здравље, Београд

КРАТАК САДРЖАЈ: До сада је откривен велики број gena који, када су мутирани или делетирани, узрокују промене у мушком репродукционом систему. Опструкциона азоспермија, која је узрок инфертилитета, у шест посто случајева последица је конгениталног недостатка ваза деференса. Такође, конгенитални недостатак ваза деференса се јавља код 95 посто мушкараца оболелих од цистичне фиброзе, која настаје услед мутација у гену *CFTR*. Новија истраживања показују да је код мушкараца инфертилних услед конгениталног недостатка ваза деференса, без клиничких знакова цистичне фиброзе, повећана учесталост мутација у гену *CFTR* у односу на учесталост мутираног gena *CFTR* у општој популацији. Пошто је код мушкараца оболелих од цистичне фиброзе нађен широк спектар оштећења репродукционог тракта одлучили смо се за анализу мутација и полиморфизама у гену *CFTR* код мушкараца, инфертилних услед олигоспермије или азоспермије, ради расветљавања могуће улоге gena *CFTR* у патогенези инфертилности мушкараца. У групи особа с опструкционом азоспермијом открили смо статистички значајно већу учесталост мутација у гену *CFTR* него у општој популацији, што указује на његово учешће у патологији инфертилности код ове групе испитаника. У групи мушкараца с поремећајем у сперматогенези или сазревању сперме учесталост мутација у гену *CFTR* такође је била већа него у општој популацији, али нижа него код испитаника с опструкционом азоспермијом. Ово указује на веће учешће других gena у процесу сперматогенезе него код опструкционе азоспермије. С обзиром да је код мушкараца инфертилних услед опструкционе азоспермије већа учесталост мутација у гену *CFTR*, они су с већим ризиком за рађање детета с цистичном фиброзом, те је код њих индикована анализа мутација у овом гену пре приступања асистираној репродукцији.

Кључне речи: ген *CFTR*, олигоспермија, азоспермија, мушки инфертилитет. (СРП АРХ ЦЕЛОК ЛЕК).

УВОД

Око 15 посто парова људи који покушавају да зачну трудноћу је инфертилно. У отприлике 30 посто случајева узрок инфертилности се приписује мушкарцу, док је код 20 посто случајева речи о комбинованој инфертилности (поремећај је и код мушкарца и код жене). Стога је код око 50 посто инфертилних парова у питању поремећај у мушком репродукционом систему.

Етиолошки фактори који доводе до инфертилности код мушкараца су многобројни. На основу природе узрока, мушка инфертилност се може поделити на ендокрину, генетичку и инфламациону. Узрок се може налазити на различитим деловима организма: у тестисима, изводним семеним каналима, помоћним полним жлездама, поремећају у депоновању сперме, хипоталамусу и хипофизној жлезди или циљним органима за андрогене хормоне.

Инфертилност код мушкараца на генетичком нивоу може бити узрокована поремећајем у хромозомима (нпр., Клинефелтеров синдром, транслокације хромозома) или у генима. Примена савремених метода молекуларне биологије у медицини открила је велики број gena с улогом у репродукцији. Ови гени када су мутирани или делетирани узрокују патолошке промене у мушком репродукционом систему. У табели 1 наведен је преглед gena за које је до сада показано да учествују у настанку мушке инфертилности.

Опструкциона азоспермија, која доводи до инфертилитета, може бити различите етиологије. У 6 посто случајева она је узрокована конгениталним недостатком ваза деференса (*CAVD* или *Congenital Absence of the Vas Deferens*) [1]. Конгенитални недостатак ваза деференса углавном се јавља спорадично, мада је досад описано неколико фамилијарних случајева [2].

Код више од 95 посто мушкараца оболелих од цистичне фиброзе јавља се опструкциона азоспермија узрокована поремећајем у развоју мезонефроса, што води агенези или атрезији епидидимиса, ваза деференса или семених кесица [3]. Цистична фиброза је наследно обољење аутозомно рецесивног типа. Ген одговоран за ову болест назван је трансмембрански регулатор проводљивости у цистичној фибрози (*CFTR* или *Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator*). Протеин *CFTR* представља хлоридни канал који се предоминантно експримише у епителјалним ћелијама, како код здравих особа, тако и код особа оболелих од цистичне фиброзе [4]. До сада је откривено преко хиљаду мутација у гену *CFTR*, с различитим ефектима на функционалност протеина, а тиме и на стање носиоца мутације. Најчешћа мутација која се јавља на хромозомима *CF* је *deltaF508* и њена учесталост у нашој популацији износи 67,2 посто [5].

Новија истраживања показују да је код мушкараца инфертилних услед конгениталног недостатка ваза деференса, без клиничких знакова цистичне фиброзе, већа учесталост мутација у гену *CFTR* него мутираног гена *CFTR* у општој популацији [6].

ЦИЉ РАДА

Пошто је код мушкараца оболелих од цистичне фиброзе нађен широк спектар оштећења репродукционог тракта, од нормалне фертилности до веома оштећене сперматогенезе, и конгенитални недостатак ваза деференса, одлучили смо се на анализу мутација и полиморфизама ДНК у гену *CFTR* код инфертилних мушкараца с олигоспермијом или азоспермијом. Циљ нам је био да утврдимо појаву и учесталост познатих мутација и полиморфизама, као и евентуално да откријемо нове, ради расветљавања могуће улоге гена *CFTR* у патогенези инфертилности мушкараца. Мушкарци с олигоспермијом или азоспермијом представљају кандидате за фертилизацију *in vitro*, па смо у овом раду желели да утврдимо и оправданост спровођења анализе гена *CFTR* код ових мушкараца пре приступања асистираној репродукцији.

МЕТОД РАДА

Испитивањем је обухваћена 21 особа с олигоспермијом или азоспермијом. Испитаници су прегледани на Уролошкој клиници у Београду, а прегледом спермограма утврђена је олигоспермија или азоспермија. У истраживање нису укључени мушкарци код којих је узрок инфертилитета био хормонски дисбаланс, хромозомске аберације или запаљењски процес.

У анализованим групама испитаника била је велика разноврсност оштећења репродукционог тракта. Да бисмо испитали могући механизам деловања гена *CFTR* у етиологији мушке инфертилности сврстали смо испитанике на основу анализе спермограма (укупне запремине, ацидности, алфа-глукозидазе, фруктозе и налаза тј. изостанка сперматозоида) у две групе. У првој групи су се налазили испитаници код којих је била опструкциона азоспермија (*V* мање од 2 *mL*; *pH* мање од 7,2; низак ниво алфа-глукозидазе или фруктозе и изостанак сперматозоида), док су се у другој групи налазиле особе код којих је инфертилност била узрокована поремећајем у сперматогенези или сазревању сперме.

ДНК која је коришћена у директној и индиректној анализи мутација у гену *CFTR* изолована је из лимфоцита периферне крви испитаника [7]. Сегменти ДНК су потом умножавани реакцијом *PCR* (*Polymerase Chain Reaction*) и коришћени у даљој анализи.

За детекцију мутација у гену *CFTR* код анализоване групе особа коришћен је приступ приказан у табели 2.

Појава мутације *deltaF508* испитивана је анализом хетеродушлекса [8]. Овим методом се истовремено може тестирати и мутација *deltaI507*, која се налази непосредно испред мутације *deltaF508*. За детекцију мутација *G542X*, *R553X* и *G551D* коришћен је метод конформационог полиморфизма једноланчане ДНК (*SSCP* или *Single Strand Conformation Polymorphism*) [9]. Мутације *621+1 G→T* и *N1303K* анализоване су поступком специфичне мутагенезе путем реакције *PCR* (*PSM - PCR-Mediated Site-Specific Mutagenesis*) [10]. Методом реверзног тзв. дот-блота, сви испитаници су анализовани на мутације *A455E*, *1717-1 G→A*, *S549N*, *R560T*, *W1282X*, *R334W*, *R347P*, *R117H*, Мутација *3849 + 10 kb C→T* и *Tn*, *F508C*, *1507V*, *1506V* полиморфизама (*Amplicor*, кит *Cystic Fibrosis*, *Roche Molecular Systems, Inc.*).

Преграживање егзона 3, 5, 6а, 8, 9, 11, 12, 14а, 14b, 15, 17b, 18, 20, 21 и 23 гена *CFTR* на мутације и полиморфизам у интрону 8 вршено је електрофорезом у градијенту денатуришућег агенса (*DGGE - Denaturation Gradient Gel Electrophoresis*) [11]. Поступком директног секвенцирања

ТАБЕЛА 1. Гени који су укључени у настанак инфертилности код мушкараца

TABLE 1. Genes known to be involved in the causation of human male infertility

Ген Gene	Место на хромозому Chromosome location	Функција продукта гена Function of gene product	Обољење узроковано променом Disorder caused by disfunction of gene
ALDP	Xq28	Пероксизомни мембрански протеин Peroxisomal membrane protein	Адреномијелопатија Adrenomyeloneuropathy
AMH	19p13	Анти-Милеров хормон Anti-Mullerian hormone	Синдром перзистентног Милеровог канала Persistent Mullerian duct syndrome.
AMH-RII	12q13	Рецептор <i>AMH</i> тип II AMH receptore type II	Синдром перзистентног Милеровог канала Persistent Mullerian duct syndrome.
AR	Xq11-12	Андрогени рецептор Androgen receptor	Синдром мушког инфертилитета (блага резистенција на андрогене хормоне) и X-везана спинална и булбарна мишићна атрофија Infertile male syndrome (mild andrc resistance) and X-linked spinal and bulbar muscular atrophy.
CFTR	7q31.2	Хлоридни канал регулисан <i>cAMP</i> -ом <i>cAMP</i> -regulated chloride channel	Цистична фиброза, конгенитални недостатак ваза деференса cystic fibrosis, CBAVD.
DAX-1	Xp21	Регулатор транскрипције Transcriptional regulator	Конгенитална адrenalна хипоплазија с хипогонадизмом Congenital adrenal hypoplasia with hypogonadotrophic hypogonadism.
DAZ	Yq11.23	Везивни протеин <i>RNK</i> RNA binding protein	Азоспермија или тешка олигоспермија Azoospermia or severe oligozoospermia.
DM	19p13.3	Протеинкиназа Protein kinase	Миотонична дистрофија Myotonic dystrophy.
FDG1	Xp11.21	-	Арског-Скотов синдром Aarskog-Scott syndrome
KAL-X	Xp22.3	-	Калманов синдром Kallmann syndrome.
LHb	19q13.32	Субјединица хормона Hormone subunit	Поремећај пубертета и инфертилитет Pubertal failure and infertility.
p57KIP2	11p15.5	Регулатор циклуса ћелија Cell cycle regulator	Беквит-Видеманов синдром Beckwith-Wiedemann syndrome.
SNRPN	15q11-13	Рибонуклеопротеин једра Nuclear ribonucleoprotein	Прадер-Вилијев синдром Prader-Willi syndrome.

анализовани су егзони 4 и 10, као и егзони у којима је методом *DGGE* детектована промена у секвенцији ДНК [12].

Разлике између учесталости алела су тестиране коришћењем теста хи-квадрат. Јатсова корекција је коришћена у табелама 2 са 2. Добијени резултати анализоване групе испитаника упоређивани су с подацима за општу популацију. Статистички значајним су сматране све величине *p* мање од 0,05.

РЕЗУЛТАТИ

Од 42 хромозома, пореклом од инфертилних мушкараца с олигоспермијом или азоспермијом, на 7 хромозома детектована је мутација у гену *CFTR*, што даје учесталост од 17 посто (7 од 42). Ова учесталост је статистички значајно већа ($p = 0,0319$) него учесталост мутираног gena *CFTR* у општој популацији белаца (2 посто).

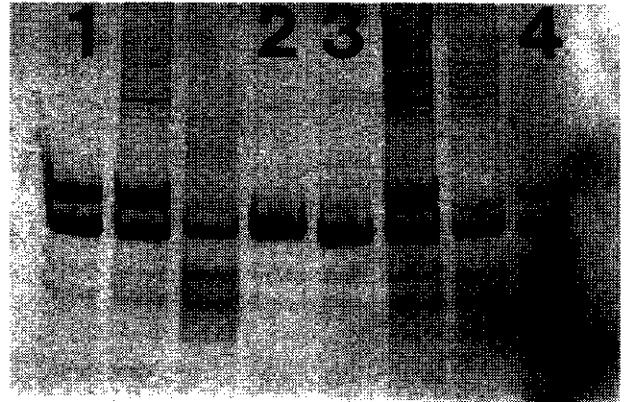
Варијанта 5Т полиморфизма *Tn* детектована је на 5 хромозома. Учесталост алела 5Т у анализованој групи испитаника (12 посто) је већа него у општој популацији (5 посто), али због малог узорка у односу на заступљеност алела 5Т у општој популацији, ова разлика учесталости није статистички значајна ($p = 0,0938$).

У групи од 10 мушкараца инфертилних услед опструкционе азоспермије детектовали смо статистички значајно већу ($p = 0,0018$) учесталост мутација у гену *CFTR* (30 посто) него у општој популацији (2 посто). Најчешћа мутација била је *deltaF508* која је детектована код 5 испитаника у хетерозиготном стању (Слика 1). Мутација *deltaF508* доводи до изостанка протеина *CFTR* на мембрани епителијалних ћелија. Код једног испитаника с мутацијом *deltaF508* на једном хромозому, на другом је детектована мутација 711+3 А→G (Слика 2). Ова мутација је детектована и код особе оболеле од цистичне фиброзе (*Cystic Fibrosis Mutation Data Base*, 1999) и још увек није испитана на нивоу функције. Положај мутације (интрон 5 gena *CFTR*) указује да би она могла да утиче на обраду *CFTR* пре-иРНК и на тај начин доведе до смањене количине протеина *CFTR* у ћелији. Код три испитаника с мутацијом *deltaF508* на једном хромозому, на другом је била варијанта 5Т полиморфизма *Tn* (Слика 3). Алели на полиморфном локусу *Tn*, који се налази испред егзона 9 gena *CFTR*, утичу на проценат правилно обрађених *CFTR* пре-иРНК. Уколико хромозом носи алел 5Т, у 90 посто случајева настаје изостанак егзона 9 у иРНК, које транслацијом не дају функционалан протеин *CFTR* [13].

У 22 анализована хромозома пореклом од инфертилних мушкараца с поремећајем у сперматогенези или сазревању сперме детектована је једна мутација - *deltaF508*, што даје учесталост мутација *CF* од 4,5 посто. Код испитаника с овом мутацијом била је тешка олигоастеноспермија. Код два испитаника с азоспермијом био је алел 5Т на по једном хромозому.

ДИСКУСИЈА

У овом раду желели смо да испитамо учешће gena *CFTR* у етиологији мушке инфертилности која не укључује само конгенитални недостатак ваза деференса. Анализовали смо 21 инфертилног мушкараца с

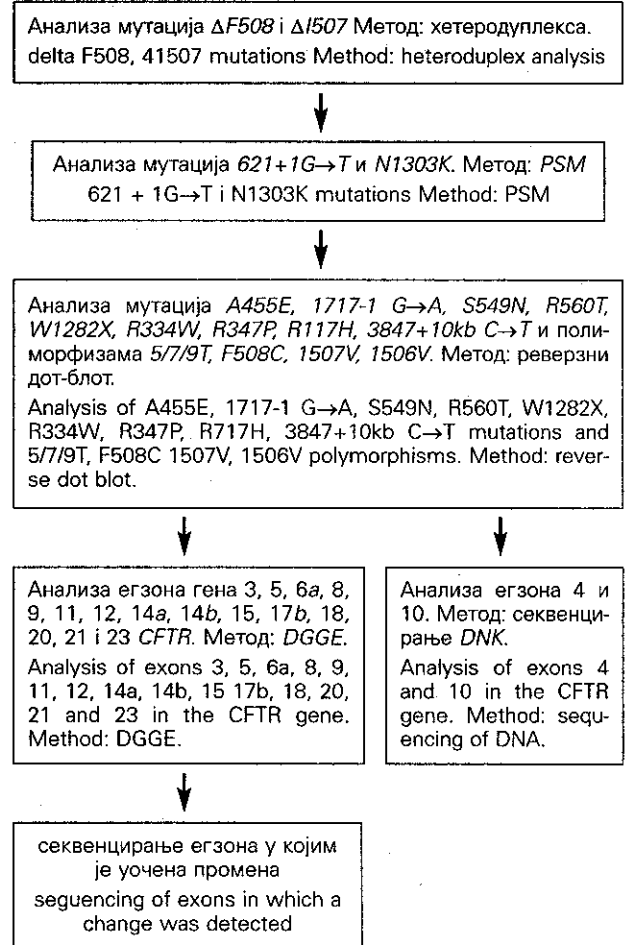


СЛИКА 1. Детекција мутације *deltaF508* и *delta1507* анализом хетеродуплекса. 1. хетерозигот за мутацију *deltaF508*; 2. Нормалан хомозигот; 3. Хомозигот за мутацију *deltaF508*; 4. Хетерозигот за мутацију *delta1507*. Раздвајање производа *PCR* вршено је електрофорезом на 10 постотном полиакриламидном гелу.

FIGURE 1. Detection of *deltaF508* and *delta1507* mutations by heteroduplex analysis. 1 - heterozygote for *deltaF508* mutation; 2 - homozygote for normal allele; 3 - Homozygote for *deltaF508* mutation; 4 - heterozygote for *delta1507* mutation. Electrophoresis of *PCR* products were performed on 10% acrylamide gel.

ТАБЕЛА 2. Стратегија претраживања мутација и полиморфизама у гену *CFTR*.

TABLE 2. Strategy for screening mutations and polymorphisms in *CFTR* gene.



олигоспермиом или азоспермијом, код којих је као узрок инфертилности искључена ендокрина и инфламациона природа, као и хромозомске аберације.

У испитиваној групи мушкараца детектована је већа учесталост мутација у гену *CFTR* (17 посто) него у општој популацији (2 посто), што указује на његово учешће у патологији инфертилности код мушкараца с олигоспермијом или азоспермијом.

У анализованој групи била је велика разноврсност оштећења репродукционог тракта. Да бисмо испитали могући механизам деловања гена *CFTR* у етиологији мушке инфертилности сврстали смо испитанике на основу клиничких и лабораторијских података у две групе: 1) испитаници с опструкцијом семених канала; и 2) испитаници с поремећајем у сперматогенези или сазревању сперме.

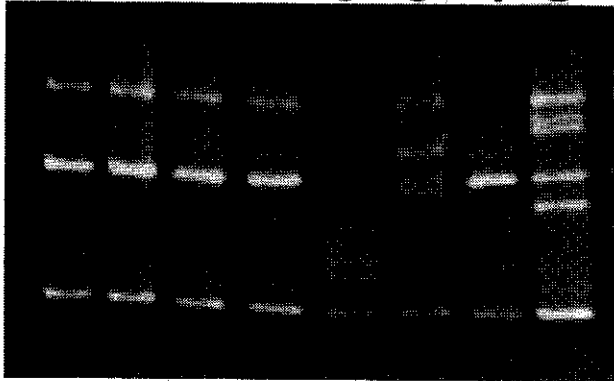
У групи од 10 испитаника с опструкционом азоспермијом детектована је статистички значајно већа учесталост мутација у гену *CFTR* него у општој популацији ($p = 0,0018$). Код једног испитаника опструкциона азоспермија би се могла објаснити мута-

цијом у оба алела гена *CFTR*. Код инфертилних мушкараца с опструкционом азоспермијом и с мутацијом *deltaF508* на једном хромозому која не даје функционалан протеин *CFTR*, а на другом, алел *5T* који смањује стварање протеина *CFTR*, у ћелијама је веома мала количина функционалног протеина *CFTR*. Ова мала количина вероватно доводи до промене само у оним органима који су најсензитивнији на дисфункцију гена *CFTR*, као што је мушки репродукциони систем, док је довољна за нормално функционисање органа који оболевају у цистичној фибрози.

Наизглед "невине" варијанте алела могу да утичу на експресију фенотипа одређених гена. Комбинације полиморфизама у различитим генима јасно доприносе развоју мултифакторијских болести. За полиморфизме у генима за аполипопротеин *E* и један-алфа-антихимотрипсин је показано да су удружени с развојем фамилијарног и спорадичног облика Алзхајмеров болести у старијем животном добу [14]. Полиморфизми у аполипопротеину *E* показују предиспозицију за васкуларна обољења [15]. Полиморфизми *HLA*, у комбинацији с одређеним полиморфизмима на другим локусима, повезани су с дијабетесом мелитусом и аутоимунским обољењима [16]. Поливаријантни мутирани гени и њихове могуће комбинације би могле да буду укључене у мултифакторијске болести. Садашње знање о полиморфизмима и њиховој улози у наследним болестима још увек је веома ограничено и зато би генетичке и функционалне студије полиморфизама у наследним обољењима биле од великог значаја у будућности.

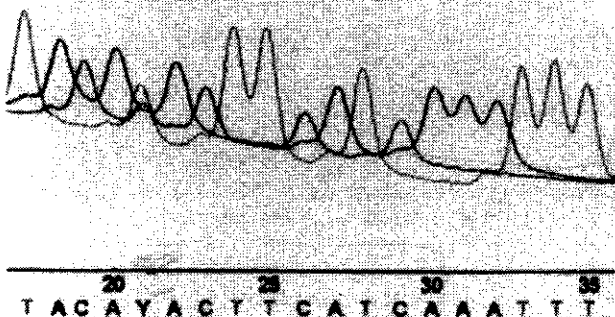
У анализованој групи испитаника с опструкционом азоспермијом у 50 посто случајева откривена је

5 6 7 8



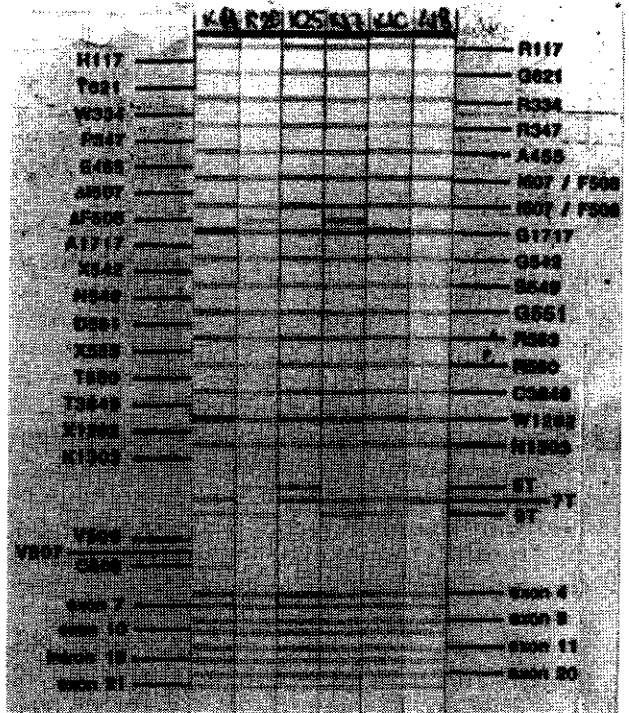
СЛИКА 2. а) Детекција мутација на основу промене термичке стабилности *DNK* (метод *DGGE*). Истовремено су анализована три различита егзона по узорку. 5 - хетерозигот за мутацију *D1152X* (егзон 18), 6 - хетерозигот за мутацију *L165S* (егзон 5), 7 - хетерозигот за мутацију *W401X* (егзон 8), 8 испитаник с мутацијом *711+3 A-G*.

FIGURE 2a) Denaturation gradient gel electrophoresis (DGGE). In each sample three different exons were analysed 5 - heterozygote for *D1152X* mutation (exon 18), 6 - heterozygote for *G165S* mutation (exon 5), 7 - heterozygote for *W401X* mutation (exon 8), 8 - patient with *711 +3 A-G* mutation.



СЛИКА 2. б) Секвенција дела егзона 5 гена *CFTR*, испитаника с мутацијом *711+3 A-G*.

FIGURE 2. b) Sequence of the region of exon 5 of *CFTR* gene, in patient with *711 +3 A-G* mutation.



СЛИКА 3. Детекција мутација методом реверзне хибридације дот-блот.

FIGURE 3. Detection of mutations by reverse dot blot method.

SCREENING OF MUTATIONS AND POLYMORPHISM IN CFTR GENE IN MEN INFERTILE DUE TO OLIGO- OR AZOSPERMIA

J. KUSHITSH¹, D. RADOJKOVITSH¹, V. MALETITSH², S. BRANKOVITSH³, A. SAVITSH¹

1. Institute of Molecular Genetics and Genetics Engineering, Belgrade; 2. Department of Urology, Clinical Centre, Belgrade; 3. Institute of Mental Health, Belgrade

INTRODUCTION

Impaired infertility of the male partner is causative or contributory to in up to one half of all couples unable to conceive spontaneously. A considerable number of genes are now known that have an essential function in human reproduction and which, when deleted or mutated, can cause pathologic changes in the male reproductive system. Congenital bilateral absence of the vas deferens (CBAVD) is an important cause of obstructive azoospermia in otherwise healthy men. It is also present in 95% of men with an autosomal recessive systematic disease - cystic fibrosis. However, clinically affected CF patients present a spectrum of genital phenotypes ranging from normal fertility to severely impaired spermatogenesis and CBAVD. Cystic fibrosis and most cases of CBAVD are caused by mutations in CFTR (cystic fibrosis transmembrane conductance regulator) gene. The aim of this study was to test the possible involvement of the CFTR gene in the aetiology of male infertility other than CBAVD.

METHODS

Twenty one infertile men with oligo or azoospermia were analysed for the presence of mutations and polymorphisms in the CFTR gene. Patients were divided in two groups according to the spermatogram: 1) patients with obstructive azoospermia (V < 2mL, pH < 7.2, low level of a-glucosidase and fructose and absence of spermatozoa; 2) patients with impaired spermatogenesis or sperm maturation. We performed direct detection for the following mutations: deltaF508 and delta1507 (heteroduplex analysis), 621+1 G→T, and N1303K (PSM - PCRmediated site-specific mutagenesis), A455E, 1717-1 G→A, S549N, R560T, W1282X, R334W, R347P, R117H, 3849+10kb C→T and Tn, F508C, 1507V, 1506V polymorphisms (reverse dot blot method). G542X, R553X and GSS1D mutations were tested by SSCP (Single Strand Conformation Polymorphism). We also performed indirect detection of mutations and polymorphisms in 3, 5, 6a, 8, 9, 11, 12, 14a, 14b, 15, 17b, 18, 20, 21 and 23 exons by DGGE (Denaturant Gradient Gel Electrophoresis). Differences between frequencies were tested by chi-square statistic. p values of less than 0.05 were considered statistically significant.

RESULTS

Among 42 chromosomes from infertile men with oligo or azoospermia we detected 7 mutations in CFTR gene (16.7%), which was significantly (p = 0.0319) more frequent than in general population (2%). Frequency of 5T allele in analysed group was high (11.9%) compared to general population (5%), but not statistically significant (0.0938). The most common mutation in the group of 10 men with

obstructive azoospermia was deltaF508. It was detected on one chromosome in five patients. In three of these patients with 4F508 mutation on the other chromosome we found 5T allele on polymorphic Tn locus. In one patient, heterozygous for deltaF508 mutation, 711+3 A→G mutation on the other chromosome was detected. In the group of 11 infertile men with impaired spermatogenesis or sperm maturation we detected one mutation - deltaF508. Two patients from this group had 5T variant on one chromosome.

DISCUSSION

We analysed 21 infertile men with oligo or azoospermia not caused by endocrine or inflammatory character, or chromosome mutations. Within this group frequency of CFTR mutations was increased compared to general population (p = 0.0319), suggesting that CFTR gene may be involved in the aetiology of infertility in men with oligo or azoospermia. In the group of patients with obstructive azoospermia 50% had at least one mutation, but only 10% had mutations in both chromosomes. One of the possible explanations would be that mutations are in the promoter region, introns or exons that were not included in analyses. The second explanation could be that some cases of obstructive azoospermia are only partially (or not) related to CFTR gene. In the group of patients with impaired spermatogenesis or sperm maturation, the frequencies of CFTR mutations and 5T allele were also increased compared to general population, but lower than in the group with obstructive azoospermia. This fact could mean that the influence of some other genes is higher in this condition than in the case of obstructive azoospermia.

CONCLUSION

We concluded that CFTR gene plays a role in the aetiology of obstructive azoospermia and that it also could be involved in some cases of impaired spermatogenesis and sperm maturation. Due to the high incidence of CFTR mutations in patients with obstructive azoospermia we suggest screening of CFTR mutations before assisted reproduction.

Key word: CFTR gene, oligospermia, azoospermia, male infertility. (SRP ARH CELOK LEK).

DRAGICA RADOJKOVIĆ

Institut za molekularnu genetiku

i genetičko inženjerstvo

11 000 Beograd, Vojvode Stepe 444a

P. O. Boks 794

Tel.: 491-391; faks : 492 - 397

бар једна мутација, док је само код 10 посто била мутација у гену *CFTR* на оба хромозома. Једно од могућих објашњења јесте да се мутације налазе у деловима гена који нису анализовани (нпр. интрони, промотор). Друго објашњење би могло да буде да су не-

ка стања опструкционе азоспермије само парцијално повезана или уопште нису у вези с геном *CFTR*.

Већа учесталост мутација и алела 5T у групи од 11 испитаника с поремећајем у сперматогенези или сазревању сперме него у општој популацији указује на

могуће учешће протеина *CFTR* у сперматогенези. Ипак, услед мањег броја хетерозиготних носилаца мутација у поређењу с испитаницима с опструкционом азоспермијом (40 посто према 4,5 посто), учешће додатних гена може бити још веће него код опструкционе азоспермије. Експресија гена *CFTR* у тестису потврђена је код инфертилних мушкараца с конгениталним недостатком ваза деференса и без њега, као и недостатком зрихих сперматида и/или појавом морфолошки оштећених сперматозоида код конгениталног недостатка ваза деференса с недовољном количином нормалних транскриптата гена *CFTR* [17], што указује да овај протеин може бити укључен у касније ступњеве развоја и сазревања герминативних ћелија.

Инфертилност код мушкараца оболелих од цистичне фиброзе типично почиње поремећајем у развоју ваза деференса или дисталног дела епидидимиса [18]. Хистолошке студије ткива тестиса мушкараца с цистичном фиброзом и изолованим конгениталним недостатком ваза деференса дале су широк спектар резултата, од нормалне до веома оштећене сперматогенезе с редукованим бројем и ненормалним облицима сперматозоида [19]. Ово упућује да протеин *CFTR* може да игра улогу у сперматогенези или сазревању сперматозоида која је независна од његове функције у развоју ваза деференса.

Азоспермија услед опструкције гениталног тракта је један од бројних могућих патофизиолошких механизма који леже у основи мушке инфертилности. У овом раду установљено је да је у 50 посто случајева опструкциона азоспермија била удружена с дефектом у гену *CFTR*. Такође, указано је и на могућу улогу протеина *CFTR* у етиологији инфертилности услед дефекта у стварању и сазревању сперме. Повезаност између неких стања инфертилности мушкараца и цистичне фиброзе захтева детаљан клинички преглед болесника, мутациону анализу *CFTR* и генетичко саветовање.

Примена поступка *MESA* (*Microsurgical Epididymal Sperm Aspiration*) или *TESE* (*Testicular Sperm Extraction*) и накнадна *ICSI* (*Intra Cytoplasmic Sperm Injection*) омогућила је мушкарцима с опструкционом азоспермијом да постану биолошки очеви [20]. С обзиром на повећану учесталост мутација у гену *CFTR* код мушкараца инфертилних услед опструкционе азоспермије, они су с повећаним ризиком за рађање детета оболелог од цистичне фиброзе. Зато је код њих индикована анализа мутација у оквиру овог гена пре приступања асистираној репродукцији.

ЗАКЉУЧАК

Испитивана је појава мутација и полиморфизама у гену *CFTR* код инфертилних мушкараца с олигоспермијом или азоспермијом. Добијени резултати ука-

зују на статистички значајно већу учесталост мутација у овом гену код инфертилних мушкараца услед опструкционе азоспермије него у општој популацији. Такође, код ове групе мушкараца повећана је и учесталост алела *5T* полиморфизма *Tn* који снижује количине функционалног протеина *CFTR* у ћелији. Анализа мутација у гену *CFTR* индикована је код мушкараца с опструкционом азоспермијом у случају да се разматра асистирана репродукција.

ЛИТЕРАТУРА

- Dubin L, Amelar RD. Ethnologic factors in 1294 consecutive cases of male infertility. *Fertil Steril* 1971;22:469-74.
- McKusick VA. Congenital bilateral aplasia of the vas deferens (277180). *Mendelian Inheritance in Man*. 11th edn. Johns Hopkins University press 1994;2255-6.
- Welsh MJ, Tsui LC, Boat TF, Beaudet AL. Cystic fibrosis. In: Scriver CR, Beaudet AL, Sly WS, Valle D (eds). *The Metabolic and Molecular Bases of Inherited Diseases*, 7th edn. McGraw-Hill, New York 1995;3799-876.
- Riordan JR, Rommens JM, Kerem BS, Alon N, Rozmahel R, Grzelczak Z et al. Identification of the cystic fibrosis gene: Cloning and characterization of complementary DNA. *Science* 1989;245:1066-73.
- Radojković D. Prenatalna dijagnostika cistične fibroze primenom metoda rekombinantne DNK. *Doktorska teza* 1997;9-12.
- Chillon M, Casals T, Mercier B, Bassas L, Lissens W, Silber S et al. Mutation in the cystic fibrosis gene in patients with congenital absence of the vas deferens. *N Engl J Med* 1995;332:1475-80.
- Del Sal G, Manfioletti G and Schneider C. The CTAB-DNA precipitation method: Common mini-scale preparation of template DNA from phagemids, phages or plasmids suitable for sequencing. *BioTechniques* 1989;7: 514.
- Rommens J, Kerem BB, Greece W, Chang P, Tsui LC. Rapid nonradioactive detection of the major cystic fibrosis mutation. *Am J Hum Genet* 1990;45:395-6.
- Kušić S, Radojković D, Savić A. Nonradioactive asymmetric PCR-SSCP assay for detection of mutations in exon 11 of the gene *CFTR*. *Balkan J Med Genetics* 1999;2:35-7.
- Friedman K, Highsmith EJ and Silverman L. Detecting multiple cystic fibrosis mutations by polymerase chain reaction-mediated site-directed mutagenesis. *Clin Chem* 1991;37:753-7.
- Fanen P, Ghanem N, Vidaud M, Besmond C, Martin J, Costes B et al. Molecular characterization of cystic fibrosis: 16 novel mutations identified by analysis of the whole *CFTR* coding regions and splice site junctions. *Genomics* 1992;13:770-6.
- Cuppens H, Lin W, Jaspers, Costes B, Teng H, Vankeerberghen A et al. Polyvariant mutant cystic fibrosis transmembrane conductance regulator genes. *J Clin Invest* 1998;101:487-96.
- Delaney S, Rich D, Thomson S, Hargrave M, Lovelock P, Welsh M et al. Cystic fibrosis transmembrane conductance regulator splice variants are not conserved and fail to produce chloride channels. *Nat Genet* 1993;4:426-31.
- Corder H, Saunders M, Strittmatter E, Schmechel C, Gaskell W, Small D et al. Gene dose of apolipoprotein E type 4 allele and the risk of Alzheimer's disease in late onset families. *Science* 1993;261:921-3.
- Davignon J, Gregg RE and Sing CF. Apolipoprotein E polymorphism and atherosclerosis. *Atherosclerosis* 1988;8:1-21.
- Todd JA. Genetic analysis of type 1 diabetes using whole genome approaches. *Proc Natl Acad Sci USA* 1995;92:8560-9565.
- Larriba S, Bassas L, Gimenez J, Ramos MD, Segura A, Nunes V et al. Testicular *CFTR* splice variants in patients with congenital absence of the vas deferens. *Hum Mol Genet* 1998;7:1739-44.
- Taussig M, Lobeck C, Di Sant-Agnese A, Ackerman R and Kattwinkel J. Fertility in males with cystic fibrosis. *N Engl J Med* 1972;287:586-9.
- Kaplan E, Shwachman H, Perlmuter A, Rule A, Khaw K, Holsclaw D. Reproductive failure in males with cystic fibrosis. *N Engl J Med* 1968;279:65-9.
- Okada H, Yoshimura K, Fujioka H, Tatsumi N, Gotoh A, Fujisawa M et al. Assisted reproduction technology for patients with congenital bilateral absence of vas deferens. *J Urol* 1999;161:1157-62.