

- esophageal carcinoma // CHIN J. Cancer RREV Treat. — 2005. — vol. 12, № 21. — P. 1669-1672.
9. Ohta M, Inoue H, Cotticelli MG, et al. The *FHIT* gene, spanning the chromosome 3p14.2 fragile site and renal carcinoma-associated t(3;8) breakpoint, is abnormal in digestive tract cancers // Cell. — 1996. — vol. 84, № 4. — P. 587-597.
 10. Shimada Y, Sato F, Watanabe G, et al. Loss of *fragile histidine triad gene* expression is associated with progression of esophageal squamous cell carcinoma, but not with the patient's prognosis and smoking history // Cancer. — 2000 — vol. 89, № 1. — P. 5-11.
 11. Sozzi G, Pastotino U, Moiraghi L, et al. Loss of *FHIT* function in lung cancer and preinvasive bronchial lesions [J]. // Cancer Res — 1998 — vol. 58, № 22 — P. 5032
 12. Yang Q, Nakamura M, Nakamura Y, et. al. Two-hit inactivation of *FHIT* by loss of heterozygosity and hypermethylation in breast cancer // Clin. Cancer Res. — 2002 — vol. 8, № 9. — P. 2890-2893.
 13. Zheng S., He ZG, Wang SB. *FHIT* genes and tumor // Foreign Medical Sciences (Pathophysiology and Clinical Medicine). — 1999. — vol. 19, № 6. — P. 417-420.
 14. Zimonjic D.B., Druck T., Ohta M., Kastury K., Croce C.M., Popescu N.C., and Huebner K. Positions of chromosome 3p14.2 fragile sites (FRA3B) within the *FHIT* gene. // Cancer Res. — 1997. — Vol. 57, №. 6 — P. 166–1170.
 15. Wu Min, Sun Kaixian. Oncological genetics — Beijing: science — 2004 — P. 870.
 16. Генетико-эпидемиологическое исследование рака пищевода в Китае. // вестник харьковского национального университета — 2006 — vol. 729, № 3 — P. 141-146.
 17. Сегрегационный и компонентный анализ рака пищевода в провинции Хебэй. // вестник харьковского национального университета - 2006 — vol. 748, № 4 — P. 87-91.

Резюме

С помощью внутригенных микросателлитов *D3S1540* и *D3S1234* выявляли делеции в области 5 и 8 экзонов гена *FHIT* у 22 больных раком пищевода. У 16 пациентов в опухолевой ткани имеется гомозиготная делеция в области 5 или 8 экзона, причём у 6 из них имеется гомозиготные делеции в обоих экзонах. Статистический анализ показал статистически значимую ($p < 0,01$) связь рака пищевода с делецией в гене *FHIT*.

За допомогою внутрігенних мікросателітів *D3S1540* і *D3S1234* визначали делеції в області 5 і 8 екзонів гену *FHIT* у 22 хворих на рак стравоходу. У 16 пацієнтів в пухлинній тканині присутня гомозиготна делеція в області 5 або 8 екзона, причому у 6 з них гомозиготні делеції присутні в обох екзонах. Статистичний аналіз показав значущий ($p < 0,01$) зв'язок раку стравохода з делецією в гені *FHIT*.

Study deletion exons 5 and 8 of *FHIT* gene in 22 cases of ESCC was evaluated by intragenic microsatellites *D3S1540* and *D3S1234*. In 16 ESCC tissues have homozygous deletion in exons 5 or 8, and in 6 cases have two deletions, as it happens, there is a deletion in both of the exons. Statistical analysis shows, that there is a connection between ESCC and deletions of *FHIT* gene ($p < 0.01$).

ЧЕРЕДНИК Ю. О.¹, ЖЕРЕБКО Н. М.², СТРИЖ В. О.¹, АНОПРИЄНКО О. В.³, ГОРОВЕНКО Н. Г.⁴, КОСТРОМІНА В. П.¹

¹Інститут фтизіатрії й пульмонології ім. Ф. Г. Яновського АМН України, вул. М. Амосова, 10, м. Київ, 03680, Україна.

²"ІнтерЛабСервіс-Україна", вул. М. Амосова, 5, Київ, 03038, Україна.

³Інститут молекулярної біології і генетики НАН України, вул. Заболотного, 150, м.

Київ, 03143, Україна.

⁴Київська Медична Академія післядипломного утворення ім. П. Л. Шупика МОЗ України, вул. Дорогожицька, 9, м. Київ, 03112, Україна. E-mail: yurach@ukr.net

ПРОБЛЕМИ ГЕНОДІАГНОСТИКИ ТУБЕРКУЛЬОЗУ

В останні роки в багатьох країнах спостерігається погіршення епідеміологічної ситуації захворюваності на туберкульоз. В Україні тенденція до зростання кількості таких хворих також зберігається. За даними ВООЗ кожного року в світі діагностується до 8 мільйонів нових випадків захворювання і більше 2 мільйонів людей помирають від цієї хвороби [9]. Основними факторами, які впливають на погіршення епідеміологічної ситуації у світі є прискорення міграційних процесів, зниження рівня соціально-економічних та екологічних умов проживання, розповсюдження ВІЛ-інфекції на фоні туберкульозу та збільшення кількості лікарсько-стійких штамів збудника туберкульозу [5, 6, 7]. Розрізняють монорезистентні та полірезистентні штами, серед яких все більшого розповсюдження набувають особливо небезпечні мультирезистентні штами (MDR), стійкі одночасно до двох основних протитуберкульозних препаратів: рифампіцину і ізоніазиду. У період з 1996 по 1999 роки MDR-штами були виявлені на 54 географічних територіях світу з 58 обстежених. Так, рівень розповсюдженості MDR-штамів на територіях країн Балтії склав: 14,1% для Естонії, 9% для Латвії і від 6% до 9% для окремих регіонів Росії [10]. Пізніше були відмічені спалахи мультирезистентного туберкульозу на територіях країн Східної Європи та Америки, для яких цей показник складав до 3% [1].

Наявність супутньої ВІЛ-інфекції у хворих туберкульозом значно знижує ефективність лікування і підвищує вірогідність несприятливого перебігу захворювання. Саме у таких хворих в 2005 році було вперше виявлено нові особливо небезпечні екстремально-резистентні штами (XDR), які окрім резистентності до рифампіцину і ізоніазиду є одночасно стійкими до будь-якого з фторхінолонів, а також до одного з трьох препаратів, таких як капреоміцин, канаміцин і амікацин [8]. Попередні дані вже показують, що близько 10% виявлених випадків MDR-ТБ насправді є XDR-ТБ [8].

В останні роки спостерігається збільшення кількості випадків захворювання туберкульозом серед дітей. Оскільки діти відносяться до найбільш вразливої категорії хворих з важким перебігом цього захворювання, раннє виявлення туберкульозної інфекції в біологічному матеріалі цих хворих є досить актуальною проблемою. Поряд із цим, особливістю туберкульозу у дітей є вкрай слабе бактеріовиділення, що ускладнює діагностику захворювання. Детекція мікобактерій туберкульозу ПЛР-методами допоможе діагностувати специфічний процес, особливо в тих випадках, коли підтвердити етіологію захворювання традиційними методами мікробіологічної діагностики не представляється можливим.

Класичні методи діагностики туберкульозу, такі як бактеріоскопія, культуральний, імуноферментний, цитологічний досить ефективні, але відрізняються або недостатньою чутливістю, або тривалістю виявлення в порівнянні з молекулярно-генетичними методами. Тому пошук нових, більш ефективних методів діагностики туберкульозу для протидії епідемії цього захворювання є життєво-важливим завданням для країни в цілому. Розвиток й удосконалення молекулярно-діагностичних методів відкриває нові перспективи для швидкого виявлення мікобактерій у клінічних зразках.

Тест-система «АмпліСенс[®] МБТ» призначена для виявлення ДНК *Mycobacterium tuberculosis complex* у біологічному матеріалі за допомогою ПЛР і була використана для оцінки ефективності методу ПЛР-діагностики туберкульозу на клінічних зразках, отриманих від дітей, хворих на туберкульоз органів дихання (ТБОД).

Матеріали й методи

Об'єм клінічного матеріалу для виділення ДНК становить 0,1мл. Виділення ДНК

проводилось відповідно до протоколу в інструкції виробника тест системи «АмпліСенс МТБ» з використанням сорбенту універсального. Перед процедурою виділення ДНК до зразків додавали ВКЗ (внутрішній контрольний зразок) *M. tuberculosis complex*, до негативного й позитивного контролів - ОКЗ й ПКЗ+ОКЗ відповідно.

Полімеразну ланцюгову реакцію проводили в ампліфікаторі з активним регулюванням (по розчину в пробірці) «Терцик» (ДНК-технологія) за наступним режимом: 1 цикл {95°C, 15 хв}, 10 циклів {95°C – 10сек, 70°C – 20сек}, 32 циклу {95°C – 5сек 72°C – 15сек}, 1 цикл {72°C - 1хв}; 10°C - зберігання.

Чутливість тест-системи «АмпліСенс[®] МБТ» становить 1×10^3 кліт/мл ліофілізованих штамів *M. tuberculosis complex* й 1×10^3 геномних еквівалентів/мл ДНК *M. tuberculosis complex* у біологічних зразках. Облік результатів ПЛР аналізу проводиться по наявності або відсутності на електрофореграмі специфічних смуг ДНК (Рис. 1). Довжина ампліфікованих специфічних фрагментів ДНК: *Mycobacterium tuberculosis* – 390 п.н., ВКЗ *Mycobacterium tuberculosis* – 750 п.н.

Результати й обговорення

Дослідження проводили на зразках патологічного матеріалу, отриманого від 22 дітей, хворих на вперше діагностований туберкульоз органів дихання (ТБОД), 12 (68%) з них становили дівчата, 10(32%) – хлопчики. Середній вік складав 14 років. Зразки включали мокротиння, промивні води бронхів, венозна кров.

Всі діти одержали щеплення БЦЖ у пологовому будинку й при надходженні в клініку вже були інфіковані МБТ (мали позитивну реакцію на 2 ТЕ РРД-Л за тестом Манту) протягом 2 і більше років. Рентгенологічно туберкульоз ТВ у фазі інфільтрації й обсіменіння встановили у 31,8% дітей, у фазі інфільтрації й розпаду - у 9,1%, у фазі інфільтрації без розпаду і/або обсіменіння - у 59,1%.

Клінічні зразки патологічного матеріалу (мокротиння, промивні води бронхів венозна кров) досліджували в активну фазу захворювання за допомогою тест-системи «АмпліСенс[®] МБТ», а промивні води бронхів – додатково за допомогою мікроскопії й посіву на щільні живильні середовища. Отриманий результат виявлення *M.tuberculosis* методом ПЛР склав 73.3%. Це було на 50% вище ($P < 0,001$) виявлення традиційними методами. Порівняльне дослідження зразків респіраторного й нереспіраторного походження дозволило визначити, що виявлення методом ПЛР із клінічних зразків мокротиння, промивних вод бронхів на 34% вище виявлення *M.tuberculosis* зі зразків крові (Рис. 1.). Подвійний забір матеріалу з різних біологічних зразків однієї хворої дитини підвищує ефективність виявлення *M.tuberculosis* на 31,8%.

Отримані результати демонструють переваги генодіагностичних методів перед традиційними та істотно підвищують можливості експрес-діагностики туберкульозу у дітей.

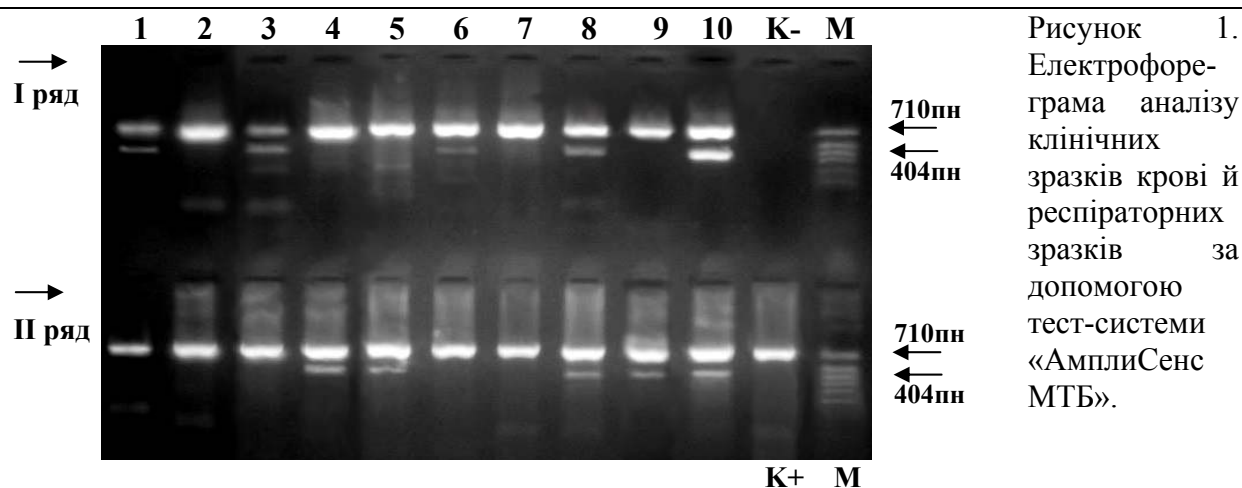


Рисунок 1. Електрофореграма аналізу клінічних зразків крові й респіраторних зразків за допомогою тест-системи «АмпліСенс МТБ».

Стрілками праворуч від малюнка зазначені смуги ДНК-маркера pBluescriptSK+/MspI

розміром 710пн й 404пн. Над малюнком і під малюнком позначені лунки з негативним і позитивним контролю та ДНК-маркером. **I ряд:** зразки в лунках 1, 3, 6, 8, 10 виявляють специфічну смугу, характерну для *M.tuberculosis*; зразки в лунках 2, 4, 5, 7, 9 демонструють відсутність *M.tuberculosis*. **II ряд:** лунки 4, 5, 8, 9, 10 – виявлення збудника *M.tuberculosis*, лунки 1, 2, 3, 6, 7, – відсутність *M.tuberculosis*. Зразки II ряду з 1 по 7 лунки представляють результат аналізу зразків хворих після завершення лікування: лунки – 1, 2, 3 аналіз зразків крові, лунки 4, 5, 6 – аналіз зразків мокротиння. В інших лунках представлені різні за походженням зразки отримані від окремих пацієнтів.

Діагностичні тест-системи на основі ПЛР, що використовують різні геномні мішені збудника ТБ, розробляються вже досить давно. Їх перевагою в цілому є висока чутливість та специфічність. Проте не існує єдиної стандартизованої методики. Для діагностичних цілей використовували окремі гени rRNA, хромосомні фрагменти, ген, що кодує 65 kDa білок теплового шоку, ген *dnaJ*, деякі інсерційні послідовності та інші ділянки геному *M.tuberculosis* [2, 3, 4]. Однак використання кожної з цих мішеней має свої переваги й обмеження. Наприклад, ген *mtp40*, який вивчали для встановлення можливості його застосування в генодіагностиці, й певні інерційні елементи присутні не у всіх штаммах *M.tuberculosis* [4]. Ефективні тест-системи на основі ПЛР, з використанням rRNA-гену як ДНК-мішені доступні комерційно (Amplior; Roche Molecular Systems, Branchburg, N.J.; GeneProbe, Inc., San Diego, Calif.) [3], однак включають додаткові етапи діагностики, такі як ДНК-гібридизація. Беручи до уваги погіршення епідеміологічної ситуації захворюваності на туберкульоз, та появу нових небезпечних мікобактеріальних штамів, дослідники продовжують пошук нових методів та стратегій для удосконалення генодіагностики цього захворювання.

Література

1. Левицька Н.А., Бажора Ю.І., Николаєвський В.В., Асмолов О.К. Медикаментозна резистентність мікобактерій туберкульозу в Одеській області України та фактори ризику розповсюдження резистентного туберкульозу: дані проспективного дворічного дослідження // Укр. Прульмонологічний журнал. – 2005. – №. 2. – С. 9-15.
2. Фещенко Ю. І., Мірошник В. М., Петренко В. М. та інші. Наукові розробки інституту фтизіатрії й пульмонології ім. Ф.Г. Яновського АМН України за 10 років // Укр. пульмонолог. журн. - 2001. - № 2. - С.5-13.
3. Beavis K.G., Lichty M.B., Jungkind D.L., and Giger O. Evaluation of Amplior PCR for direct detection of Mycobacterium tuberculosis from sputum specimens // J. Clin. Microbiol. - 1995 - V. 33. - P.2582-2586.
4. Dziadek J., Sajduda A., and Borun T.M. Specificity of insertion sequence-based PCR assays for mycobacterium tuberculosis complex // Int J Tuberc Lung Dis - 2001. - V.5. - P.569-574.
5. Enserink M. In Hiv era, an old TB vaccine causes new problems //Science. - 2007. - V.318. - P.1059.
6. Espinal M.A., Laszlo A., Simonsen L., et al. Global trends in resistance to antituberculosis drugs. World Health Organization-International Union against Tuberculosis and Lung Disease Working Group on Anti-Tuberculosis Drug Resistance Surveillance // N Engl J Med. 2001 Apr 26;344(17):1294-303.
7. Iñigo J., García de Viedma D., Arce A., et al, Analysis of Changes in Recent Tuberculosis Transmission Patterns after a Sharp Increase in Immigration J. Clin. Microbiol. - 2007 - V.45. - P.63-69.
8. Raviglione M.C and, Smith I.M. XDR tuberculosis - implication for Global Public Health // N. Engl. J. Med. - 2007. - V.365. - P.656-659.
9. World Health Organization. 2003. W.H.O. report 2003 global tuberculosis control. <http://www.who.int/gtb/publications/globrep/index/html>.
10. Yam W.C., Tam C.M., Leung C.C., et al. Direct Detection of Rifampin-Resistant

Резюме

У роботі представлені результати аналізу виявлення збудника ТБ у дітей, хворих ТБОД, у клінічних зразках респіраторного й нереспіраторного походження за допомогою тест-системи «АмплиСенс МТБ». Обговорюється сучасний стан проблеми молекулярної діагностики туберкульозу й вибору ефективних методів генодіагностики.

В работе представлены результаты анализа выявления возбудителя ТБ у детей, больных ТБОД, в клинических образцах респираторного и нереспираторного характера с помощью тест-системы «АмплиСенс^Р МТБ». Обсуждается современное состояние проблемы молекулярной диагностики туберкулеза и выбора эффективных методов для генодиагностики.

The results of analysis of TB pathogene detection in clinical specimens of respirator and nonrespirator character from children, suffering from lung tuberculosis, by PCR-test-system «АмплиСенс МТБ» are presented. The modern state problems of molecular diagnostics and the choice of effective methods of TB DNA-diagnostics are considered.

ЧОРНА Л.Б., ТРЕТЯК Б.І., МАРКЕВИЧ Н.В., МАКУХ Г.В., АКОПЯН Г.Р.

ДУ "Інститут спадкової патології АМН України",

Україна, 79000, м. Львів, вул. М.Лисенка 31а, e-mail: lilyachorna1@rambler.ru

РОЗПОДІЛ АЛЕЛЕЙ ПОЛІМОРФНИХ ЛОКУСІВ ГЕНА ІНТЕРЛЕЙКІНА-10 У ПАЦІЄНТІВ З СИНДРОМОМ НІЙМЕГЕН

Синдром Ніймеген (Nijmegen breakage syndrome, NBS) - це аутосомно-рецесивне спадкове захворювання з важким перебігом, що належить до групи синдромів хромосомної нестабільності (СХН) і характеризується мікроцефалією, комбінованим Т-і В-клітинним імунodefіцитом, схильністю до онкологічних захворювань та чутливістю до іонізуючої радіації [10]. Причиною виникнення даної патології є мутантні зміни гена NBN, що кодує білок нібрин (p95). Найбільш поширеною мутацією, локалізованою в гені NBN, є мутація 657del5. Частота виникнення синдрому Ніймеген суттєво коливається у різних країнах, від 1:3000000 новонароджених у Німеччині до 1:133000 в Україні [1, 3]. На 2000 рік у 16 країнах світу було описано 130 хворих на NBS. При цьому, близько 95% всіх хворих виявились слов'янського походження [3]. Головною причиною смертності хворих на синдром Ніймеген є розвиток онкологічної патології та хронічні синопульмонарні інфекції. У 60% пацієнтів з синдромами хромосомної нестабільності розвиваються пухлини лімфоретикулярної системи, переважно злоякісні неходжкінські В-клітинні лімфоми з ранньою маніфестацією [4]. Значне поширення онкологічних захворювань у відносно ранньому дорослому віці зареєстровано серед гетерозиготних носіїв мутації 657del5. Тип лімфоретикулярної пухлини, вік в якому починається розвиток захворювання, швидкість прогресування та ефективність лікування відрізняються у різних пацієнтів з синдромом Ніймегена [7, 8].

На сьогоднішній день залишається не з'ясованою роль мутації 657del5 у патогенезі злоякісних неходжкінських лімфом. Імовірно, що клінічний перебіг синдрому Ніймеген можуть обумовлювати додаткові генетичні чинники, зокрема, вплив генів – модифікаторів генної мережі організму, котрі за певних умов визначають схильність організму до розвитку тієї чи іншої патології. Серед них особливої уваги заслуговує ген інтерлейкіну –10 (IL - 10). Інтерлейкін–10 входить до групи цитокінових молекул з імуносупресивною активністю і продукується значним спектром клітин