

### **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<sup>Р</sup> 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

імунної системи [2]. Критична роль IL - 10 як важливого регулятора імунної системи проявляється в ряді онкологічної патології, зокрема при негоджкінських лімфомах, меланомі та карциномі [5,7]. Промоторна частина гена IL-10 містить ряд крапкових нуклеотидних варіацій (SNP), які відповідають за високу чи низьку експресію IL-10, ці ж SNP-варіації формують алелі схильності до різних захворювань, зокрема таких як аутоімунні та онкологічні. До них належать SNP -1082 A→G, -819 T→C та -592 A→C і власне для них характерним є явище впливу на рівень експресії цитокіну. Алелями “високої” експресії визначені алелі: -1082 G, -819 C та -592 C; алелі “низької” експресії: -1082 A, -819 T та -592 A.

Отже, метою роботи було дослідити частоту та розподіл алелей поліморфних варіантів гена IL-10 (1082 A→G, -819 T→C та -592 A→C) у групі пацієнтів з синдромом Ніймеген для встановлення можливих генетичних передумов клінічного перебігу даної патології.

### **Матеріали і методи**

Матеріалом для дослідження були зразки ДНК пацієнтів з NBS, що проходили молекулярно-генетичне обстеження у Інституті спадкової патології АМН України. Проводили виділення та очистку ДНК із лейкоцитів периферійної крові методом ферментативного розщеплення та подальшої фенольної екстракції або методом висолювання. Молекулярно-генетичний аналіз мутацій проводили методом полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР) на приладі “Терцик” (“ДНК-технології”, Росія) з використанням реактивів, олігонуклеотидних послідовностей та ендонуклеази рестрикції (“МБІ Fermentas”). Для подальшого аналізу поліморфного варіанту гена IL-10 1082 A→G, використовували метод ПДРФ. Детекцію крапкових поліморфізмів гена IL - 10 -819 T→C та -592 A→C проводили за допомогою ARMS-ПЛР (Amplification Refractory Mutation System). Фрагменти ДНК розділяли методом електрофорезу у 3% агарозному гелі та візуалізували в УФ-транслюмінаторі.

### **Результати та обговорення**

Першим етапом роботи було формування груп пацієнтів з підозрою носійства мутації 657del5 гена NBN. Основним діагностичним критерієм слугувала мікроцефалія без зниження інтелекту, або із незначним його зниженням. Створено банк ДНК пацієнтів з підозрою синдрому Ніймеген та членів їх родин (74 пробанди, 122 батьків, 8 сибсів).

Проведено молекулярно - генетичне дослідження мутації 657del5 гена NBN у 204 осіб із різних регіонів України. Молекулярно-генетичний аналіз носійства мутації 657del5 гена NBN в групі пацієнтів з мікроцефалією та підозрою на NBS дозволив виявити випадки гомозиготного носійства мутації 657del5 та верифікувати синдром Ніймеген. У сім'ях пробандів встановлено гетерозиготне носійство даної мутації. Слід відмітити, що загальносвітові дані налічують інформацію про 190 випадків синдрому Ніймеген, а у даній роботі молекулярно-генетично верифіковано 22 випадки даного захворювання. Усі пацієнти були гомозиготами за мутацією 657del5 гена NBN. Підтверджено успадкування даної мутації від батьків пробандів.

Наступним етапом роботи було дослідження крапкових нуклеотидних поліморфізмів (SNP) -1082 G→A, -819 T→C та -592 A→C промоторної ділянки гена IL-10 у пацієнтів із синдромом Ніймеген. Для контролю генотиповано 73 практично здорові людини без обтяженого анамнезу, онкологічної чи аутоімунної патології.

За результатами молекулярно-генетичного аналізу розподілу генотипів поліморфного локусу -1082 G→A гена IL-10, у контрольній групі співвідношення по частоті A – та G –алелів склало 54,8% до 45,2% відповідно, а серед пацієнтів з NBS частота A- алелю – 47,4% та G – 52,6%. У групі пацієнтів із синдромом Ніймеген частота G -алелю переважала її частоту в контрольній групі, проте ця різниця не є статистично вірогідною. Провівши аналіз розподілу генотипів поліморфного локусу – 1082 G→A гена IL-10, ми виявили підвищення частоти GG – генотипу (42,2%) у групі

пацієнтів з NBS у порівнянні з контрольною групою (21%), а також значне зниження частоти GA-генотипу - 21% проти 49% відповідно. Результати молекулярно-генетичного дослідження поліморфних локусів гена IL-10 серед пацієнтів із синдромом Ніймеген та у контрольній групі наведено у таблиці 1.

Таблиця 1

**Частота генотипів досліджуваних поліморфних локусів гена IL-10**

Генотип	Контрольна група, %	Дослідна група, %	$\chi^2$	P
IL1082AA	30,0	36,8	0,31	p>0,05
IL1082GA	49,0	21,0	4,90	p<0,05
IL1082GG	21,0	42,2	4,10	p<0,05
IL819CC	76,2	52,6	2,43	p>0,05
IL819CT	19,0	31,6	0,83	p>0,05
IL819TT	4,80	15,8	1,35	p>0,05
IL592CC	66,7	52,6	0,82	p>0,05
IL592AC	33,3	47,4	0,82	p>0,05
IL592AA	0	0	-	-

A-алель та AA - генотип SNP –1082 G→A гена IL-10 пов'язані з низьким рівнем продукції інтерлейкіна - 10, а G- алель та GG – генотип відповідає за “високу” експресію цього гена. Дослідження розподілу SNP –1082 G→A IL-10 в групі пацієнтів з NBS показало статистично вірогідне підвищення частоти GG-генотипу, тобто дані результати засвідчили спадково обумовлену схильність пацієнтів з NBS до продукції високих рівнів IL - 10.

Проведено молекулярно-генетичне дослідження розподілу алелів та генотипів SNP –819 T→C та –592 A→C гена інтерлейкіна – 10 методом алель-специфічної ПЛР. У групі пацієнтів з NBS частота A- алелі SNP –592 A→C переважала її частоту в контрольній групі – 23,7% проти 16,7%. У випадку SNP –819 T→C – частота T –алелю була вищою у пацієнтів з NBS – 31,6% проти 14,3 % у контрольній групі. Встановлено вищу частоту генотипів TT та CT у дослідній групі в порівнянні з контрольною: 15,8% до 4,8% та 31,58% до 19% відповідно. Проте, відмінності, щодо розподілу даних алелів у досліджуваних групах, не є статистично вірогідними.

Проаналізувавши поєднання алелів усіх трьох досліджуваних поліморфізмів, встановлено, що серед пацієнтів з NBS переважали наступні генотипи: GCC/GCC – 21,1%; ACC/ACC – 15,8%; ACA/ATC, GTA/GTC, GCA/ATC - по 10,53%. Інші комбінації алелів виявлені у поодиноких випадках. Генотипи SNP –1082, –819, –592 GCC/ACC; GCC/ATA визначені як генотипи “середньої” експресії гена IL - 10. Вважають, що наявність поліморфізму, визначеного як „поліморфізм експресії”, приводить до зміни константи зв'язування транскрипційних факторів, що зумовлює різну експресійну здатність гена [6]. Показано, що гаплотипи „низької” та „середньої” експресії ATA і ACC, що формуються SNP –1082 A→G , –819 T→C та –592 A→C гена IL - 10, можуть підвищувати схильність до розвитку агресивних негоджкінських лімфом та бути одними з генетичних факторів, які впливають на її розвиток.

В зв'язку з тим, що наше дослідження мало деякі обмеження (малий обсяг вибірки, низька частота синдрому Ніймеген) його слід розглядати, як попереднє. Отримані нами данні слід перевірити на більшій вибірці хворих з NBS. Також доцільно визначити реальний рівень продукції інтерлейкіну-10 у хворих на синдром Ніймеген з різними генотипами.

**Висновки**

1. Проведено молекулярно - генетичне дослідження мутації 657del5 гена NBN та верифіковано 22 випадки синдрому Ніймеген.

2. Виявлено статистично вірогідну різницю у розподілі частоти GG- та AG-генотипу SNP -1082 G→A гена IL - 10 в групі пацієнтів з синдромом Ніймеген у порівнянні з контролем.
  3. Відмінності, щодо розподілу алелів та генотипів SNP -819 T→C та -592 A→C гена інтерлейкіна - 10 у групі пацієнтів з синдромом Ніймеген у порівнянні з контролем не є статистично вірогідними.
  4. Щодо поєднання алелів трьох досліджуваних поліморфізмів промоторної ділянки гена IL-10, серед пацієнтів з синдромом Ніймеген переважали наступні генотипи: GCC/GCC – 21,1%; ACC/ACC – 15,8%; ACA/ATC, GTA/GTC, GCA/ATC - по 10,53%.
  5. Показано роль поліморфізмів промоторних ділянок гена IL-10, як можливих імуногенетичних чинників клінічного перебігу синдрому Ніймеген.
- Роботу виконано при фінансовому сприянні Західно-Українського Біо-Медичного Дослідницького Центру підтримки молодих вчених (WUBMRC).

### Література

1. Акоюн Г., Савицький В., Федоришин З., та ін. Селективний скринінг мікроцефалії в популяції Львівської області з метою ранньої діагностики та профілактики онкологічної патології // Проблеми екологічної та медичної генетики і клінічної імунології. Зб. Наук. праць. Київ-Луганськ-Харків. – 2004. – с.21-26.
2. Akdis C.A., Joss A., Akdis M., Faith A., Blaser K. A molecular basis for T cell suppression by IL-10: CD28-associated IL-10 receptor inhibits CD28 tyrosine phosphorylation and phosphatidylinositol 3-kinase binding. // FASEB. J. – 2000. – Vol. 14. – p. 1666–1668.
3. Carlomagno F., Chang-Claude J., Dunning A. M., Ponder B. A. J. Determination of the frequency of the common 675del5 Nijmegen breakage syndrome mutation in the German population: no association with risk of breast cancer // Genes Chromosomes Cancer. – 1999. – Vol. 25. – p. 393-395.
4. Cunningham LM, Chapman C, Dunstan R, Bell MC, Joske DJ // Polymorphisms in the interleukin 10 gene promoter are associated with susceptibility to aggressive non-Hodgkin's lymphoma. Leuk Lymphoma. – 2003. -N44, – P.251–255.
5. Hirakata A., Inami T., Saito M. et al. Diagnostic value of interleukin-10 and interleukin-6 in the vitreous of intraocular malignant lymphoma patients // Nippon Ganka Gakkai Zasshi. – 2004. – Vol. 108, N6. – p. 359-367.
6. Kube D, Platzner C, von Knethen A, Straub H, Bohlen H, Hafner M, Tesch H. Isolation of the human interleukin-10 promoter. Characterization of the promoter activity in Burkitt's lymphoma cell lines // Cytokine. – 1995, V.7, N1. – p. 360-367.
7. Nemunaitis J., Fong T., Shabe P, Martineau D., Ando D. Comparison of serum interleukin-10 (IL-10) levels between normal volunteers and patients with advanced melanoma // Cancer Investig. – 2001. – Vol. 19. – p. 239-247.
8. Nijmegen breakage syndrome. The International Nijmegen Breakage Syndrome // Dis Child. – 2000.- Vol. 82.- p. 400-406.
9. Seemanova E., Passarge E., Beneskova D., Houstek J., Kasal P., Sevcikova M., Familial microcephaly with normal intelligence, immunodeficiency, and risk of lymphoreticular malignancies: a new autosomal recessive disorder // Am. J. Med. Genet. – 1985. - Vol. 20. - p. 639 - 648.
10. Weemaes C. M. R., Hustinx T. W. J., Scheres J. M. J. C. et al. A new chromosomal instability disorder: the Nijmegen breakage syndrome // Acta Paediat. Scand. - 1981. - Vol. 70.- p. 557-564.

## Резюме

Досліджували частоту та розподіл алелів трьох поліморфних варіантів гена IL-10 у групі пацієнтів з синдромом Ніймеген. Виявлено статистично вірогідну різницю у розподілі частоти GG– та GA- генотипу SNP –1082 G→A гена IL - 10 в дослідній групі порівняно із контрольною групою. Показано, що серед пацієнтів з NBS переважали генотипи GCC/GCC – 21,1% та ACC/ACC – 15,8%.

Исследовали частоту и распределение алелей трёх полиморфных вариантов гена IL-10 среди пациентов с синдромом Ниймеген. Установлена статистически достоверная разница в распределении частот GG– и GA- генотипов SNP –1082 G→A гена IL -10 в группе пациентов в сравнении с контрольной. Результаты указывают, что среди пациентов с NBS преобладают генотипы GCC/GCC – 21,1%; ACC/ACC – 15,8%.

The distribution of interleukin-10 gene promoter single nucleotide polymorphism (SNP) among the NBS patients has been studied. The difference of frequency of GG– and GA- SNP –1082 G→A genotypes of IL-10 genes was statistically significant between patients and healthy controls. The GCC/GCC (21, 1%) and ACC/ACC (15, 8%) genotype among the NBS patients was prevalent.

## ШТАНДЕЛЬ С.А.

Государственное учреждение «Институт проблем эндокринной патологии им. В.Я.Данилевского АМН Украины»,  
Украина, 61002, Харьков, ул. Артема, 10, e-mail: [shtandel@mail.ru](mailto:shtandel@mail.ru)

## ЕСТЕСТВЕННЫЙ ОТБОР РАКА ЩИТОВИДНОЙ ЖЕЛЕЗЫ В СОВРЕМЕННЫХ УСЛОВИЯХ

Естественный отбор – процесс, который, будучи наиболее важным фактором эволюции, способствует повышению приспособленности и предотвращает разрушительные последствия всех остальных процессов. Концепция естественного отбора – противоречивая проблема эволюционной генетики человека. Несмотря на популярность гипотезы «нейтральной эволюции», большинство генетиков считают, что отбор сыграл решающую роль в эволюции видов и сформировал все биологическое разнообразие популяций человека [1]. При рассмотрении больших популяций человека различают следующие типы отбора: 1) внутригрупповой, основанный на межиндивидуальных различиях в приспособленности (дифференциальное размножение генотипов) и 2) межгрупповой, принимающий во внимание различия в средней приспособленности популяций (дифференциальный естественный прирост отдельных групп) [2]. Однако использование применительно к человеку концепции биологической приспособленности, измеряемой числом жизнеспособных потомков, вызывает ряд трудностей, поскольку не учитывает специфики социальной организации человеческого общества. Так, широкое распространение практики планирования семьи и успехи репродуктивной медицины привели к нивелированию межсемейных различий по числу потомков и снижению давления отбора. Важным предсказуемым последствием этого явился рост генетического груза популяции. Технологии современной медицины позволяют «откорректировать» фенотипические проявления ряда наследственно обусловленных заболеваний, создать адаптивную среду для генотипов, которые в более жестких условиях были бы элиминированы отбором, и тем самым повысить их приспособленность. Этот феномен получил название «дисгенный эффект медицины» [3, 4]. Изменение давления внутригруппового отбора (например, путем успешного лечения мультифакториальных болезней) приводит к изменению кривой распределения предрасположенности к данному заболеванию и, следовательно,