

**RYMAR S.E., RACHKEVICH N.O., KULACHKO A.V., RUBAN T.A., KORDIUM V.A.**

*Institute of Molecular Biology and Genetics of NASU*

*Ukraine, 03680, Kyiv, Acad. Zabolotny str., 150, e-mail: s.y.rymar@imbg.org.ua*

*SI «Institute of Genetic and Regenerative Medicine» NASMU*

*Ukraine, 04114, Kyiv, Vyshgorodska str., 67*

## **ENCAPSULATED GENETICALLY MODIFIED CELLS OF CHO-K1 AS SOURCE OF HUMAN RECOMBINANT FGF2**

**The aim** of the investigation was to obtain the transgenic mammalian cell line CHO-K1 that expresses recombinant human FGF2 and secretes it into cultural medium and to compare the abilities of a monolayer cell culture and the cells encapsulated in alginate microcapsules to produce and to secrete this protein.

**Methods.** The non-viral gene transfer method, RT-PCR, Western blot analysis were used for the investigation. **Results.** The expression vector pC1-F contained the recombinant human FGF2 had been constructed. This vector was used for the CHO-K1 cells transfection. As a result, a stable transgenic cell line expressing FGF2 was obtained. A few positive signals were detected via Western blot analysis of the conditioned cultural media. The same protein products were revealed in a case of the conditioned cultural media where alginate microcapsules with the transgenic cells had been cultivated. **Conclusion.** Thus the obtained genetically modified CHO-K1 cells remain a source of the recombinant human FGF2 after their encapsulation in alginate microcapsules.

**Key words:** recombinant human FGF2, transfection, encapsulation, alginate microcapsule.

## **СОСНІНА К.О.**

*ДУ «Інститут спадкової патології НАМН України»*

*Україна, 79000, м. Львів, вул. Лисенка 31-а, e-mail:katja.sosnina@gmail.com*

## **ДОСЛІДЖЕННЯ ПОЛІМОРФІЗМУ ІНСЕРЦІЯ/ДЕЛЕЦІЯ 14 П.Н. ГЕНА НЕКЛАСИЧНОГО АНТИГЕНА HLA-G ПРИ НАВИКОВОМУ НЕВИНОШУВАННІ ВАГІТНОСТІ НЕЗ'ЯСОВАНОГО ГЕНЕЗУ**

Однією із центральних проблем імунології репродукції є дослідження імунних процесів, що забезпечують нормальний перебіг вагітності та народження дитини, а також з'ясування патологічних механізмів, що призводять до втрати вагітності [15]. Чисельні дослідження показують, що успішна імплантація та розвиток плода відбуваються завдяки еволюційно виробленим імунним механізмам, котрі захищають плід, в тому числі, і від згубної дії материнської імунної системи. Один із таких механізмів полягає у включенні на самих ранніх етапах онтогенезу людини унікальних генів HLA-системи, так званих неklasичних генів Ib класу HLA-G, HLA-E, HLA-F [4, 10, 15].

Відомо, що на ембріональних клітинах класичні антигени HLA I-го та II-го класу не експресуються і це запобігає конфлікту між HLA-напівчужерідними клітинами плода та імунною системою матері [8, 9, 17, 11]. Тим не менше, існує інша небезпека – клітини, позбавлені HLA-антигенів на поверхні, можуть зазнавати НК-опосередкованого лізису. Але цьому запобігають неklasичні HLA-антигени:

сильна експресія молекул HLA-G на клітинах цитотрофобласту разом з експресією HLA-E та HLA-F в плаценті перешкоджає НК-опосередкованого лізису ембріональних клітин [3, 5, 15].

Найбільш вивченими неklasичними HLA-антигенами є антигени класу G. Зокрема, першою вивченою та найбільш дослідженою функцією HLA-G молекул є інгібування НК і T-опосередкованого лізису клітин за рахунок прямої взаємодії з рецепторами ILT2 і ILT4 та KIR2DL4. Експресія HLA-G на трофобласті може протистояти імунному нагляду клітин НК, а також інгібувати їх трансдотеліальну міграцію. HLA-G, взаємодіючи з ILT-2 та/або іншими гальмівними рецепторами НК-клітин, впливає на експресію адгезивних молекул на НК клітинах. Ці дані вказують на те, що антигени HLA-G на материнсько-плодовому бар'єрі можуть запобігати трансплацентарній міграції маткових НК клітин, а також нейтралізувати накопичені НК клітини через взаємодію з їхніми кілерінгібіторними рецепторами [1,11]. Іншою функцією HLA-G є регулювання цитотоксичної

відповіді Т-клітин через супресію проліферації Т-лімфоцитів. Антиген HLA-G може також впливати на цитотоксичні Т-лімфоцити та маткові НК клітини, змінюючи їх цитокіновий профіль [2, 3, 6].

З накопичених даних про функцію HLA-G, як важливого чинника у модуляції материнської імунної системи під час вагітності [3, 13, 16], зрозуміло, що будь які зміни, що призводять до аномальної експресії даного гена, можуть бути задіяні в репродуктивній невдачі. Описані поліморфізми в регуляторній області гена *HLA-G* впливають на експресію даного гена, і тому можуть асоціюватись з репродуктивними втратами [2, 4, 10, 12]. Цікавим і мало вивченим з цієї точки зору є поліморфізм інсерція/делеція 14 п.н. (5'-ATTTGTTTCATGCCT-3') в 3'UTR, що локалізується в позиції 3741 8 екзона гена *HLA-G*. Вперше даний поліморфізм був описаний в 1993 р. Харрісоном і його колегами [7], але ли-

### Матеріали і методи

Матеріалом для дослідження слугувала ДНК 40 жінок ідіопатичним навиковим невиношуванням вагітності, 135 зразків ДНК, виділених з ворсин хоріона мимовільно елімінованих ембріонів та 40 зразків ДНК жінок контрольної групи з щонайменше 2-ма здоровими дітьми. Виділення та очищення ДНК з лейкоцитів периферійної крові проводили методом висолювання. З ворсин хоріона ДНК виділяли за допомогою методу фенольної екстракції. Детекції поліморфізму інсерція/делеція 14 п.н. 3'UTR гена *HLA-G* проводили за допомогою полімеразної ланцюгової реакції. ПЛР проводили в автоматичному режимі на термоциклері «Терцик» (ДНК-технологія, Росія). Продукти ампліфікації візуалізували шляхом проведення електрофоре-

### Результати та обговорення

Генотипування поліморфізму інсерція/делеція 14 п.н. 3'UTR гена *HLA-G* було вперше проведено у Україні та вперше у світі на матеріалі мимовільно елімінованих ембріонів. Досліджувану групу склали жінки з ранніми 2–3 разовими репродуктивними втратами нез'ясованого генезу, які звернулися для медико-генетичного консультування у Львівський міжобласний медико-генетичний центр. Всебічні клінічні, лабораторні та медико-генетичні обстеження цих жінок дозволили поставити діагноз «ідіопатичне навикове невиношування вагітності». Всього обстежено 40 жінок

ше нещодавно був показаний вплив розміру мРНК транскрипту на стабільність білка HLA-G [12, 14]. Наявність алеля з інсерцією 14 п.н. спричиняє видалення 92 п.н. в 3'UTR з мРНК, можливо тому, що він діє як прихований сайт сплайсингу. В послідовності з 14 нуклеотидів є ініціаторний пентаметр AUUUG, що імовірно бере участь в деаденілюванні і подальшому розпаді мРНК. Відсутність такого мотиву в транскрипті з делетованими 92 нуклеотидами може забезпечувати більшу стабільність мРНК [20]. Оскільки поліморфізм інсерція/делеція 14 п.н. 3'UTR безпосередньо впливає на рівень експресії гена *HLA-G* [18, 19], і таким чином може мати значення для пролонгування вагітності метою даного дослідження було встановити розподіл та частоту даного поліморфізму у жінок з ідіопатичним навиковим невиношуванням вагітності та у матеріалі мимовільно елімінованих ембріонів.

зу в 2 % агарозному гелі, який містив бромистий етидій та сканували на ультрафіолетовому транслюмінаторі «ECX-15. M» (VILBER LOURMAT, Франція). Результати сканування агарозних гелів знімали цифровою камерою «Gel Imager» (HELICON, Росія). Обробку зображень здійснювали на комп'ютері за допомогою програм Adobe Photoshop CS та Gel Explorer 2.0.

Статистичне опрацювання результатів проводили з використанням критерію Пірсона  $\chi^2$ . Для всіх видів аналізу критичний рівень значущості для статистичних критеріїв приймався рівень  $p < 0,05$ . Асоціацію генотипів з ризиком репродуктивних втрат оцінювали за допомогою розрахунку коефіцієнту шансів (Odds ratio, OR) з 95 % довірчим інтервалом.

з навиковим невиношуванням вагітності (ННВ), 135 мимовільно елімінованих ембріонів людини 5-12 тижнів гестації та 40 репродуктивно здорових жінок.

Першим етапом роботи було встановлення частоти та розподілу генотипів поліморфізму інсерція/делеція 14 п.н. 3'UTR гена *HLA-G* у жінок з ідіопатичним ННВ. Отримані результати представлені у таблиці 1. Розподіл генотипів у дослідній та контрольних групах відповідав рівновазі Харді-Вайнберга. У групі жінок з ННВ, як і у контрольній групі з найвищою частотою зустрічається гетерозиготний генотип за

поліморфізмом інсерція/делеція 14 п.н. (50 % та 65 % відповідно). Частота гомозиготного генотипу за алелем делеція (D) у дослідній групі жінок склала 22,5 % у порівнянні з трохи вищою

його частотою у контролі – 25 %. Гомозиготний генотип за алелем інсерція (I) 14 п.н. зустрічався у 11 (27,5 %) жінок з ННВ, що майже втричі більше від показника у контролі (10 %).

Таблиця 1. Аналіз розподілу поліморфізму інсерція/делеція 14 п. н. 3'UTR гена *HLA-G* у жінок з ННВ

Генотип	Жінки ННВ (n=40)			Контрольна група (n=40)			$\chi^2$	P	OR(CI)
	n	%	HWE (p=1)	n	%	HWE (p=0.16)			
I/I	11	27,5	0.276	4	10	0.181	<b>4,021</b>	<b>&lt;0,05</b>	<b>3.4138</b> <b>(1.065 – 11.8502)</b>
D/I	20	50	0.499	26	65	0.489	1,841	>0,05	0.5385 (0.2194 – 1.3218)
D/D	9	22,5	0.226	10	25	0.331	0,069	>0,05	0.871 (0.3106 – 2.4422)

Провівши статистичну обробку даних з використанням критерію Пірсона  $\chi^2$ , показано вірогідно значиме зростання частоти гомозиготного генотипу за алелем інсерція (I) 14 п.н. ( $\chi^2=4,021$ ,  $P<0,05$ ) у групі жінок з ННВ у порівнянні з контрольною групою. Розрахунок коефіцієнту шансів (OR-odds ratio) показав зростання більше, ніж у 3-и рази ризику невиношування вагітності у жінок-носіїв гомозиготного генотипу за алелем інсерція (I) 14 п.н. 3'UTR гена *HLA-G* (OR=3.41 CI-95 %: 0.98–11.85).

Наступним етапом дослідження було

проаналізувати розподіл та частоту генотипів поліморфізму інсерція/делеція 14 п.н. 3'UTR гена *HLA-G* у матеріалі мимовільно елімінованих ембріонів у порівнянні з контрольною групою. Отримані результати представлені у таблиці 2. Розподіл генотипів у дослідній та контрольних групах відповідав рівновазі Харді-Вайнберга. Серед досліджуваної групи, яку склали 135 спонтанно елімінованих ембріона 5–12 тижнів гестації з найвищою частотою зустрічався гетерезиготний генотип за даним поліморфізмом (47,7 %).

Таблиця 2. Аналіз розподілу поліморфізму інсерція/делеція 14 п. н. 3'UTR гена *HLA-G* у матеріалі мимовільно елімінованих ембріонів

Генотипи	Спонтанно еліміновані ембріони (n=135)			Контрольна група			$\chi^2$	P	OR(CI)
	n	%	HWE (p=0.76)	n	%	HWE (p=0.14)			
I/I	38	28.8	0.277	7	13	0.198	<b>5.233</b>	<b>&lt;0.025</b>	<b>2.71</b> <b>(1.13 – 6.54)</b>
I/D	63	47.7	0.499	34	63	0.494	4.1	<0.05	0.54 (0.28 – 1.03)
D/D	31	23.5	0.224	13	24	0.309	0.027	>0.05	0.97 (0.46 – 2.03)

Частота гомозиготного генотипу за алелем делеція (D) 14 п.н. склала 23,5 %, що не відрізняється від його частоти в контролі (24 %). Гомозиготний генотип за алелем інерція (I) 14 п.н. зустрічався у 2 рази частіше у групі спонтанно елімінованих ембріонів у порівнянні з контрольною групою (28,8 % та 13 % відповідно). Статистичне опрацювання отриманих результатів з використанням критерію Пірсона ( $\chi^2$ ) показало статистично вірогідне

підвищення частоти гомозиготного генотипу за алелем інсерція 14 п.н. у групі спонтанно елімінованих ембріонів у порівнянні з контрольною групою ( $\chi^2 =5,23$ ;  $p<0.025$ ). Розрахунок коефіцієнту шансів (Odds ratio, OR) з 95% довірчим інтервалом показав зростання у 2,7 разів ризику виникнення навикового невиношування вагітності у носіїв гомозиготного генотипу за алелем інсерція 14 п.н. (OR=2.71, CI 95%: 1.13 – 6.54).

Враховуючи отримані результати щодо розподілу та частоти генотипів поліморфізму інсерція/делеція 14 п.н. 3'UTR гена *HLA-G* у жінок з ННВ та в матеріалі мимовільно

елімінованих ембріонів, можемо припускати, що поліморфізм, який безпосередньо впливає на експресію гена *HLA-G*, може мати значення для пролонгування вагітності.

### Висновки

1. У групі жінок з ідіопатичним навиком невиношуванням вагітності встановлено статистично вірогідне підвищення частоти гомозиготного генотипу за алелем інерція (I) 14 п.н. гена *HLA-G* у порівнянні з контрольною групою.

2. У матеріалі мимовільно перерваних ембріонів гомозиготний генотип за алелем інерція 14 п.н. гена *HLA-G* статистично вірогідно підвищений у порівнянні з контроль-

ною групою.

3. Розрахунок коефіцієнту шансів показав у 3 рази збільшення ризику ранньої втрати вагітності у жінок носіїв генотипу I/I, а також збільшення ризику у 2,7 рази при наявності даного генотипу у ембріона.

4. Припускаємо, що поліморфізм інсерція/делеція 14 п.н. 3'UTR гена *HLA-G* має значення для пролонгування вагітності.

### Література

1. Abbas A., Tripathi P., Naik S. Analysis of human leukocyte antigen (HLA)-G polymorphism in normal women and in women with recurrent spontaneous abortions // *Eur J Immunogenet.* – 2004. – №31. – P. 275–278.
2. Aruna M., Sirisha P.V. Role of 14-bp insertion/deletion polymorphism in HLA-G among Indian women with recurrent spontaneous abortions // *Tissue Antigens.* – 2011. – Vol. 2, №77. – P. 131–13.
3. Carosella E.D., Dausset J. Immunotolerant functions of HLA-G // *Cell Mol Life Sci.* – 1999. – Vol. 3, № 55. – P. 327–333.
4. Castro M.J., Morales P. Evolution of MHC-G in humans and primates based on three new 3'UT polymorphisms // *Hum Immunol.* – 2000. – Vol. 5, №61. – P. 1157–1163.
5. Clements C.S., Kjer-Nielsen L., Kostenko L. Crystal structure of HLA-G: a nonclassical MHC class I molecule expressed at the fetal-maternal interface // *Proc Natl Acad Sci USA.* – 2005. – Vol. 10, №102. – P. 3360–3365.
6. Dara S., Hogge A. Comprehensive Analysis of HLA-G: Implications for Recurrent Spontaneous Abortion // *Reproductive Sciences.* – 2010. – Vol. 17, №4. – P. 331–338.
7. Harrison G.A., Humphrey K. E., Jakobsen I. B. A 14 bp deletion polymorphism in the HLA-G gene / *Hum. Mol. Genet.* – 1993. – Vol. 2, №220. – P. 45–49.
8. Hunt J.S., Petroff M.G., McIntire R.H. HLA-G and immune tolerance in pregnancy // *The FASEB Journal.* – 2005. – №19. – P. 681–693.
9. Hunt J.S., Langat D.K., R.H McIntire The role of HLA-G in human pregnancy // *Reprod Biol Endocrinol.* – 2006. – Vol. 10, №4 – P. 45–48.
10. Hviid T., Hylenius S. HLA-G polymorphisms in couples with recurrent spontaneous abortions // *Tissue Antigens.* – 2002. – Vol. 60, №2. – P. 122–132.
11. Hviid T.V., Hylenius S., Lindhard A. Association between human leukocyte antigen-G genotype and success of in vitro fertilization and pregnancy outcome // *Tissue Antigens.* – 2004. – Vol. 1, №64. – P. 66–69.
12. Moreau P., Contu L., Alba F. HLA-G Gene Polymorphism in Human Placentas: Possible Association of G\*0106 Allele with Preeclampsia and Miscarriage // *Biology of Reproduction.* – 2008. – Vol. 79, №3. – P. 459–467.
13. Ober C., Chervoneva I., Billstrand C. Variation in the HLA-G Promoter Region Influences Miscarriage Rates // *J Hum. Genet.* – 2003. – Vol. 72, №5. – P. 1425–1435.
14. Pfeiffer K.A., Fimmers R. The HLA-G genotype is potentially associated with idiopathic recurrent spontaneous abortion // *Molecular Human Reproduction* – 2001. – Vol.7, №4. – P. 373–378.
15. Raj K., Tripathi P. Role of HLA-G, HLA-E and KIR2DL4 in Pregnancy // *J Hum. Genet.* – 2007. – Vol. 7, №3. – P. 219–233.
16. Tripathi P., Abbas A., Naik S. Role of 14-bp deletion in the HLA-G gene in the maintenance of pregnancy // *Tissue Antigens.* – 2004. – № 64. – P. 706–710.
17. Vauvert T., Hviid F. HLA-G in human reproduction: aspects of genetics, function and pregnancy complications // *Hum. Reprod. Update.* – 2006. – Vol. 12, №3. – P. 209–232.
18. Xue S., Yang J. Recurrent spontaneous abortions patients have more -14 bp/+14 bp heterozygotes in the 3'UT region of the HLA-G gene in a Chinese Han population // *Tissue Antigens.* – 2007. – Vol. 11, №69. – P. 153–155.
19. Yan W.H., Lin A., Chen X.J. Association of the maternal 14-bp insertion polymorphism in the HLA-G gene in women with recurrent spontaneous abortions // *Tissue Antigens.* – 2006. – Vol. 6, №68. – P. 521–523.
20. Zhu Y., Huo Z., Lai J. Case-control study of a HLA-G 14-bp insertion-deletion polymorphism in women with recurrent miscarriages // *Scand J Immunol.* – 2010. – Vol. 1, №71. – P. 52–54.



**SOSNINA K.**

*Institute of Hereditary Pathology of the Ukrainian National Academy of Medical Sciences  
Ukraine, 79000, Lviv, Lysenko str., 31-a, e-mail: katja.sosnina@gmail.com*

### **THE STUDYING OF HLA-G 14 b.p. INSERTION/DELETION POLYMORPHISM AMONG WOMEN WITH IDIOPATHIC RECURRENT PREGNANCY LOSS (RPL)**

The **aim** of this study was to determine the distribution and frequency of HLA-G 14 bp insertion/deletion polymorphism in women with idiopathic recurrent pregnancy loss and in spontaneously aborted embryos. **Methods.** DNA was isolated from the peripheral blood cells and chorionic villi. DNA was subjected to polymerase chain reaction and electrophoresis in 2 % agarose gel. **Results.** Significantly higher HLA-G 14 bp insertion/insertion genotype frequency ( $\chi^2 = 4,021$ ,  $P < 0.05$ ) in group of women with RPL compared to control group was established. Calculation of odds ratio (OR) showed more than 3-fold increase of miscarriage risk in women homozygous for HLA-G 14 bp insertion/insertion genotype (OR = 3.41 CI - 95 %: 1.065–11.85). Significantly higher HLA-G 14 bp insertion/insertion genotype frequency ( $\chi^2 = 5.233$ ,  $< 0.025$ ) in group of spontaneously aborted embryos was also established and risk of spontaneous abortions in homozygous HLA-G 14 bp insertion/insertion genotype is increased up to 3 times (OR = 2.71, CI-95 %: 1.13–6.54). **Conclusions.** we assume that homozygous HLA-G 14 bp insertion/insertion genotype is one of the risk factors of recurrent pregnancy loss in women.

**Key words:** idiopathic recurrent pregnancy loss (RPL), HLA-G 14 bp insertion/deletion polymorphism.

**ТИРКУС М.Я.**

*ДУ «Інститут спадкової патології НАМН України»*

*Україна, 79000, м. Львів, вул. Лисенка, 31-а, e-mail: tyrkus.m@ihp.lviv.ua*

### **ЧАСТОТА МУТАЦІЇ CCR2-64I ГЕНА ХЕМОКІНОВОГО РЕЦЕПТОРА CCR2, ЩО АСОЦІЮЄТЬСЯ З УПОВІЛЬНЕННЯМ ПРОГРЕСУВАННЯ СНІДУ СЕРЕД ЖИТЕЛІВ ЗАХІДНОГО РЕГІОНУ УКРАЇНИ**

Хемокінами – це секреторні білки, що беруть участь у процесах дозрівання, перенесення і рециркуляції лейкоцитів. Вони також відіграють важливу роль у багатьох патофізіологічних процесах, таких як алергічні реакції, інфекції, аутоімунні захворювання, запальні процеси, розвиток пухлин. Відкриття останніх років виявили тісний зв'язок між хемокінами, хемокіновими рецепторами та ВІЛ-інфекцією. Окрім добре відомої ролі блокування проникнення вірусної частки шляхом зв'язування з рецепторами, роль хемокінів виявилися глибоко залучена в процес патогенезу ВІЛ [1].

Імунологічні або генетичні зміни, які впливають на рівень хемокінів, можуть впливати на сприйнятливість до ВІЛ-інфекції або швидкість прогресування захворювання після інфікування. Відтак, об'єктивне прогнозування ступеня схильності і клінічного варіанту перебігу хвороби потребує з'ясування природи провідних зовнішніх провокуючих середників та визначення і диференціації фенотипічних ефектів окремих генів з урахуванням, що частоти окремих алельних варіантів суттєво варіюють

у популяціях [2, 3].

Поліморфізми генів рецепторів хемокінів *CCR5* і *CCR2* пов'язані зі стійкістю до ВІЛ-1-інфекції або затримкою розвитку СНІДу. Вивільнення хемокінів є ранньою реакцією на інфікування вірусом, причому мутація *CCR5-del32* гена *CCR-5* асоційована з більш повільною прогресією захворювання, а мутація *CCR2-64I* гена *CCR2* пов'язана зі значним уповільненням падіння імунного статусу [4, 5].

Гомозиготи по мутації *CCR5-del32* гена хемокінового рецептора *CCR5* набувають стійкості до зараження вірусом R5-HIV-1. Гетерозиготи мають в два рази нижчу кількість рецепторів *CCR-5*, що значно сповільнює реплікацію вірусу і прогресію захворювання [5, 6]. Нами проведено молекулярно-генетичне дослідження мутації *CCR5del32* гена рецептора хемокінів *CCR5* серед осіб Західного регіону України. У даній вибірці мутацію *CCR5del32* в гетерозиготному виявлено у 20,37 % осіб. Отримані результати говорять про достатньо високу частоту даної мутації у порівнянні з іншими вибірками України [6, 7, 8].

Хемокіновий рецептор *CCR-2b* є мінорним