

**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

корцептором для ВІЛ. Мутація в гені *CCR2* призводить до заміни валіну на ізолеїцин в положенні 64 першого трансмембранного домену рецептора і зустрічається з частотою 10-25% у різних популяціях. Наявність цієї мутації асоційована з затримкою розвитку СНІДу, але механізми захисту незрозумілі, так як рецептор *CCR-2* дуже рідко використовується вірусом як корцептор і мутація не викликає зміни кількості рецепторів *CCR-2* та не впливає на передачу сигналу від *CCR-2*-специфічних лігандів. Показано, що варіант 64I рецептора *CCR-2* може утворювати димери з білком *CXCR-4* (він замінює рецептор *CCR-5*, який може бути основним рецептором для вірусу на пізніх стадіях захворювання), в той час як природнього білока *CCR-2* – немає. Це дозволяє припустити, що

### Матеріали і методи

Матеріалом для дослідження слугувала ДНК 147 практично здорових осіб, які є вихідцями і проживають на території Західної України. У досліджуваній групі кількість осіб чоловічої склало 47,6 % та 52,4 % осіб жіночої статі. Вік обстежуваних був у межах від 23 до 43 років. Проводили виділення та очищення ДНК з лейкоцитів периферійної крові методом висолування [10]. Ампліфікацію послідовностей ДНК *in vitro* проводили, використовуючи метод полімеразної ланцюгової реакції [11]. ПЛР проводили в автоматичному режимі на термоциклері «Терцик» (ДНК-технологія, Росія). Для ідентифікації мутацій 64I-*CCR2* застосовували метод рестрикційного аналізу продуктів ПЛР відповідних послідовностей. У

### Результати та обговорення

У результаті цієї роботи апробовано методику молекулярно-генетичного дослідження мутації 64I гена рецептора хемокінів *CCR2* (номер поліморфізму в базі даних NCBI – rs1799864) [24]. Для ідентифікації мутацій 64I-*CCR2* застосовували метод рестрикційного аналізу продуктів ПЛР відповідних послідовностей. Електрофореграму молекулярно-генетичного дослідження мутації 64I-*CCR2* наведено на рис. 1.

Проведено молекулярно-генетичне дослідження мутації *CCR2*-64I гена хемокінового рецептора *CCR2* у 147 практично здорових осіб, які є вихідцями і проживають на

*CCR2* 64I затримує розвиток СНІДу шляхом уповільнення зміни *CCR-5* на *CXCR-4* у пацієнтів, що є переломним моментом у виснаженні CD4 Т-лімфоцитів і початком прояву симптомів СНІДу [9].

Отже, вивчення поширеності даних мутацій та ідентифікація гомо- та гетерозигот серед жителів Західного регіону України є важливим для прогнозування епідеміологічної ситуації щодо ВІЛ/СНІД у майбутньому та дасть можливість використати дані у генно-інженерних розробках ліків та вакцин проти ВІЛ.

Тому, метою даної роботи було встановити частоту мутації *CCR2*-64I гена хемокінового рецептора *CCR2*, що пов'язана зі значним уповільненням падіння імунного статусу серед осіб Західного регіону України.

роботі використовували ендонуклеазу рестрикції *Bse8 I* виробництва фірми НВО "СибЭнзим" (Росія) [12]. Продукти ампліфікації візуалізували шляхом проведення електрофорезу в 2 % агарозному гелі, який містив бромистий етидій та сканували на ультрафіолетовому транслюмінаторі «ЕСХ-15. М» (VILBER LOURMAT, Франція). Отримані сигнали порівнювали з маркерами довжин, і на основі цього детектували розміри отриманих фрагментів. 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.

території Західної України. Отримані результати показали, що у досліджуваній групі мутацію *CCR2*-64I в гетерозиготному стані виявлено у 19 осіб, що становить 12,92 %. Мутацію *CCR2*-64I в гомозиготному стані виявлено у 2 осіб, що становить 1,36 %. Частота алелі 64I становить 7,82 % (23/294) (рис. 2).

Проведено розподіл гетерозиготних носіїв мутації *CCR2*-64I гена хемокінового рецептора *CCR2* відносно статі. У жінок мутацію *CCR2*-64I в гетерозиготному стані виявлено у 13 із 77 осіб, що становить 16,9 %, у чоловіків мутацію *CCR2*-64I в гетерозиготному стані виявлено у 6 із 70 осіб, що становить 8,6 %.

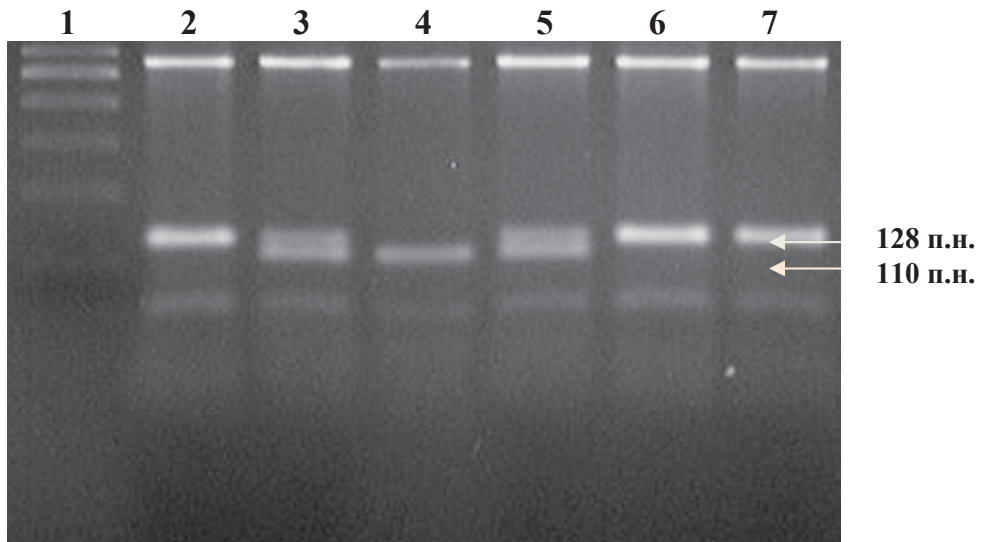


Рис.1. Електрофореграма ПЛР реакції (2 % агарозний гель): 1 – маркери молекулярної ваги; 2, 6, 7 – відсутність мутації CCR2-64I; 3, 5 – гетерозиготи за мутацією CCR2-64I; 4 – гомозигота за мутацією CCR2-64I

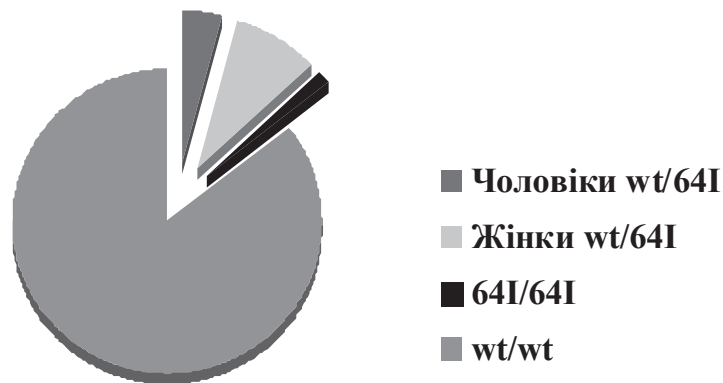


Рис. 2. Частота мутації CCR2-64I гена хемокінового рецептора CCR2 у осіб досліджуваної групи

Отже, мутацію CCR2-64I в гетерозиготному стані у жінок детектували в двічі частіше ніж у чоловіків

Враховуючи результати попередніх досліджень, виявлено одну компаунд гетерозиготу за мутаціями CCR5del32/CCR2-64I [6]. Зокрема, частота мутації CCR5del32 гена хемокінового рецептора CCR5 серед осіб Західного регіону України є достатньо високою та становить 20,37 % .

Отримані результати що до поширеності мутації CCR2-64I гена рецептора хемокінів CCR2 серед осіб Західного регіону України є співмірними у порівнянні з іншими європейськими етнічними групами [13, 14] і відносить обстежену популяцію до таких, де з

середньою частотою виявляється дана мутація. З найвищою частотою >35 % мутація CCR2-64I зустрічається в південно-сахарських африканських популяціях, а також з досить високою частотою у азіатських популяціях. З нижчою частотою мутація CCR2-64I наявна у європейських, кавказьких та американських етнічних групах (10–25 %). Самі найнижчі частоти даної мутації в тихоокеанських острівних популяціях.

Отже, дані щодо поширення протекторних алелів серед жителів Західного регіону України дозволять спрогнозувати епідеміологічну ситуацію щодо ВІЛ/СНІД у майбутньому. Дані про генетично зумовлену індивідуальну стійкість чи навпаки підвищену чутливість до ВІЛ можуть бути використаними для розрахунку коефіцієнту

відносного ризику розвитку СНІД і смерті в результаті СНІД для кожної популяції. Результати досліджень у подальшому можна бути викорис-

тано у генно-інженерних розробках ліків та вакцин проти ВІЛ.

### Висновки

1. У дослідженій групі жителів Західної регіону України мутацію CCR2-64I в гетерозиготному стані виявлено 12,92 %.

2. Мутацію CCR2-64I в гомозиготному стані виявлено у 2 осіб, що становить 1,36 %.

3. Мутацію CCR2-64I в гетерозиготному стані у жінок детектували в двічі частіше, ніж у чоловіків.

4. Отримані результати щодо частоти мутації CCR2-64I гена рецептора хемокинів CCR2 у осіб Західного регіону України є співмірними з іншими європейськими етнічними групами і відносить обстежену популяцію до таких, де з середньою частотою виявляється ця мутація.

### Література

1. Frade J.M., Llorente M., Mellado M. The amino-terminal domain of the CCR2 chemokine receptor acts as coreceptor for HIV-1 infection // *J. Clin Invest.* – 1997. – Vol. 100. – P. 497–502.
2. Novembre J., Galvani A.P., Slatkin M. The geographic spread of the CCR5 Delta32 HIV-resistance allele // *PLoS Biol.* – 2005. – Vol. 3, №11. – P. 339.
3. Limborska S.A., Balanovsky O.P., Balanovskaya E.V. Analysis of CCR5Delta32 geographic distribution and its correlation with some climatic and geographic factors // *Hum Hered.* – 2002. – Vol. 53, №1. – P. 49–54.
4. Martinson J.J., Hanga L., Karanicolas R. Global distribution of the CCR2-64I/CCR5-59653T HIV-1 disease-protective haplotype // *AIDS.* – 2000. – Vol. 14. – P. 483–489.
5. Allers K., Hütter G. Evidence for the cure of HIV infection by CCR5Δ32/Δ32 stem cell transplantation // *Blood – Journal of The American Society of Hematology.* – 2011. – Vol. 117, №10. – P. 2791–2799.
6. Тиркус М.Я., Макух Г.В., Акопян Г.Р. Частота мутації CCR5del32 гена хемокинового рецептора CCR5 серед жителів Західного регіону України // *Досягнення і проблеми генетики, селекції та біотехнології: зб. наук. пр.* – 2012. – Т. 3. – С. 386–390.
7. Лившиць Л.А., Пампуха В.Н., Кравченко С.А. Распространение делеции 32 п.н. в гене рецептора хемокинов CCR5 в разных регионах Украины // *Цитология и генетика.* – 2000. – Т. 34, №5 – С. 18–21.
8. Довженко С.П., Подольська С.В., Горовенко Н.Г. Вплив поліморфних варіантів гена TP53 і гена хемокинового рецептора CCR5 на ризик виникнення раку молочної залози у жінок з України // *Журн. АМН України.* – 2010. – Т. 16, додаток. – С. 55–56.
9. Winkler C.A., Hendel N., Carrington M. Dominant Effects of CCR2–CCR5 Haplotypes in HIV-1 Disease Progression // *J. Acquir Immune Defic Syndr.* – 2004. – Vol. 37. – P. 1534–1538
10. Пат. 32044 UA, МПК G01N33/49 (2006.01) Спосіб виділення ДНК з лейкоцитів периферійної крові / Макух Г. В., Заставна Д.В., Тиркус М. Я. [та ін.], заявник ДУ «Інститут спадкової патології АМНУ». – № u200801896; заявл. 14.02.2008; опубл. 25.04.2008, Бюл. №8.
11. Mc. Pherson M.J., Quirke P., Taylor G.R. PCR a Practical Approach. Oxford University press // New York: Oxford University press, 1993. – 253 p.
12. Acosta A.X., Sampaio R.G., Spinola J.L. Distribution of the CCR2-64I allele in three Brazilian ethnic groups // *Genet. and Mol. Biol.* – 2003. – Vol. 26, №3. – P. 241–243.
13. Кофиади И. А., Ребриков Д.В., Трофимов Д. Ю. Распределение аллелей генов CCR5, CCR2, и SDF1 ассоциированных с устойчивостью к ВИЧ-инфекции в российских популяциях // *Докл. Акад. Наук.* – 2007. – Т. 415, № 6. – С. 320–323.
14. Ioannidis J.P.A., Rosenberg P.S., Goedert J.J. Effects of CCR5-D32, CCR2-64I, and SDF-1 3\*A Alleles on HIV-1 Disease Progression: An International Meta-Analysis of Individual-Patient Data / Ioannidis J.P.A. [et al.] // *Annals of Internal Medicine.* – 2001. – Vol. 135, №9. – P. 782–785.

### TYRKUS M.

*Institute of Hereditary Pathology of the Ukrainian National Academy of Medical Sciences  
Ukraine, 79000, Lviv, Lysenko str., 31-a, e-mail: tyrkus.m@ihp.lviv.ua*

### FREQUENCY OF MUTATION CCR2-64ICHEMOKINE GENE RECEPTOR, WHICH IS ASSOCIATED WITH DELAYED PROGRESSION TO AIDS IN PEOPLE FROM WESTERN REGION OF UKRAINE

**Aims.** The rate of progression of HIV-1 disease exhibits a remarkable variation among different individuals. Several natural polymorphisms in the genes for the human CC-chemokine receptors CCR5 and CCR2 are



associated with HIV-1 disease. associated with a delayed progression to disease. The aim of this study was to determine the frequency of chemokine receptor gene mutation CCR2-64I in people from Western region of Ukraine. **Methods.** DNA from the above samples was isolated using a modified salting out method. Extracted DNA was amplified by Polymerase chain reaction (PCR). The PCR products were subsequently digested with the restriction enzyme Bse8 I and subjected to electrophoresis in a 2 % agarose gel. **Results.** A molecular genetic study of chemokine receptor gene mutation CCR2-64I performed in 147 people from Western region of Ukraine. The frequency of CCR2-64I heterozygote was 12.92 % and the frequency of CCR2-64I homozygous was 1.36 % in the studied group. CCR2-64I mutation were more frequently in group of women (16.9 %) than in group of men (8.6 %). **Conclusions.** The results show relatively high genetic resistance to HIV infection in people from Western region of Ukraine. *Key words:* HIV infection, chemokine receptor, mutation.

**УТЕВСКАЯ О.М.**<sup>1,2</sup>, **АГДЖОЯН А.Т.**<sup>3,2</sup>, **ПШЕНИЧНОВ А.С.**<sup>2</sup>, **ДИБИРОВА Х.Д.**<sup>2,3</sup>, **ЧУХРЯЕВА М.И.**<sup>3</sup>, **АТРАМЕНТОВА Л.А.**<sup>1</sup>, **БАЛАНОВСКАЯ Е.В.**<sup>2</sup>, **БАЛАНОВСКИЙ О.П.**<sup>3,2</sup>

<sup>1</sup> Харьковский национальный университет имени В.Н. Каразина  
Украина, 61022, Харьков, пл. Свободы, 4, e-mail: outevsk@yandex.ru

<sup>2</sup> Медико-генетический научный центр РАМН  
Россия, Москва

<sup>3</sup> Институт общей генетики им.Н.И. Вавилова РАН  
Россия, Москва

## СХОДСТВО УКРАИНСКИХ ПОПУЛЯЦИЙ ИЗ РАЗЛИЧНЫХ ТЕРРИТОРИАЛЬНЫХ ПОДРАЗДЕЛЕНИЙ ПО МАРКЕРАМ Y-ХРОМОСОМЫ

Начиная с XIII в. и вплоть до середины XX в. некоторые части украинской территории, сохранявшие славянское население Киевской Руси, находились в составе различных политических образований: западные территории - Волынь и Галиция - входили в состав Литовского государства, Речи Посполитой, Польши; территория Закарпатья входила в состав Венгерского королевства, Австро-Венгрии; Буковина была частью Молдавского княжества, Австро-Венгрии и Румынии; центральные районы Украины и Слобожанщина заселялись мигрантами из западных областей Украины в XV–XVII вв.;

### Материалы и методы

В период с 2001 по 2011 гг. был проведен ряд экспедиций по сбору биологического материала среди коренных украинцев. Выбирались регионы, где украинское население наименее подверглось метисации, поэтому обследуемая территория охватывала западные, центральные, северные и северо-восточные части Украины. Сбор материала (венозная кровь, 13 мл) проводился на базе районных больниц и поликлиник; донорами были жители небольших населенных пунктов – неродственные друг другу мужчины, коренные украинцы, предки которых по отцовской и материнской линиям до 3-го поколения относились к украинскому этносу и проживали в

восточные и центральные регионы с XVIII в. входили в состав Российской империи. Сложные популяционно-демографические процессы определили подразделение современной Украины на ряд исторических областей, что могло привести и к генетической дифференциации украинских популяций. Целью данной работы было сравнить генетическое разнообразие региональных подразделений в пределах украинского этноса по гаплогруппам Y-хромосомы, полиморфизм которой является наиболее эффективным маркером для разграничения близких популяций [1, 2].

данном районе (области). Каждый донор подписывал информированное согласие на исследование. При исследованиях соблюдена полная анонимность.

ДНК из донорской крови выделена фенол-хлороформным методом. Определение эффективной концентрации ДНК проводилось методом ПЦР в реальном времени с использованием набора Quantifiler Human DNA Kit (Applied Biosystems) на амплификаторе ABI 7900HT (Applied Biosystems). Образцы ДНК от 1197 украинцев из 13 популяций, представляющих основные исторические территории Украины (Закарпатье, Волынь, Галиция, Буковина, Полесье,