

8. *Tucker J.D., Morgan W.F., Awa A.A. et al.* A proposed system for scoring structural aberrations detecting by chromosome painting. *Cytogenet. Cell Genet.*, 1995.-vol. 68.- P. 211-221,
9. *Lucas J.N., Awa A., Straume. T. et al.* Rapid translocation frequency analysis in humans decades after exposure to ionizing radiation.// *Int. J. Radiat. Biol.*- 1992.- vol. 62, N 1.P. 53-63.
10. *Lucas J., Hill F., Burk C. et al.* Dose-response curve for chromosome translocations induced by low-dose rate <sup>137</sup>Cs gamma rays // *Rad. Prot. Dosimetry.*- 1995.- vol.68.- P.761-765.

### **Резюме**

За допомогою методу FISH проведено верифікацію офіційних доз опромінення у 180-ти ліквідаторів Чорнобильської аварії. Встановлено, що середньогрупові біологічні дози опромінення у цивільних ліквідаторів та реконвалесцентів гострої променевої хвороби були дещо нижчими за офіційні внаслідок домінування випадків переоцінки індивідуальних офіційних доз. У військових ліквідаторів встановлена протилежна тенденція.

С помощью метода FISH проведена цитогенетическая верификация официальных доз облучения у 180-ти ликвидаторов Чернобыльской аварии. Показано, что среднegrupповые биологические дозы облучения у гражданских ликвидаторов и реконвалесцентоv острой лучевой болезни были несколько ниже официальных из-за преобладания случаев переоценки индивидуальных официальных доз. У военных ликвидаторов установлена противоположная тенденция.

With the help of FISH technique cytogenetical verification of the Official Dose Records (ODR) in 180 liquidators of Chernobyl accident had been fulfilled. In the civil liquidators and patients recovered from acute radiation sickness the cases with overestimated individual ODR had been predominated as well as in the liquidators from Military Register the cases with underestimation of ODR in comparison with biological radiation doses had been prevailed.

### **ЗАГАНЯЧ Я.Ю., ТЕРПИЛЯК О.І., ЗАСТАВНА Д.В.**

*ДУ «Інститут спадкової патології АМН України»*

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

### **ІМУНОГЕНЕТИЧНИЙ АНАЛІЗ РАННІХ РЕПРОДУКТИВНИХ ВТРАТ У ЖІНОК ІЗ СХИЛЬНІСТЮ ДО УРОГЕНІТАЛЬНИХ ІНФЕКЦІЙ**

Причини репродуктивних втрат у людини – різноманітні і до кінця не з'ясовані, серед яких найбільш загадковою є «поведінка» імунітету. Більше того, цілий ряд авторів взагалі вважають, що втрата плоду, особливо на ранніх термінах вагітності, має переважно імунну етіологію [1- 5].

Останнім часом при вивченні причин невиношування вагітності особливу увагу дослідників привертає наявність в організмі інфекцій, що передаються статевим шляхом, так звані інфекції TORCH-комплексу. Особливістю такого роду інфекцій є те, що в більшості випадків вони протікають безсимптомно, для них характерний рецидивуючий перебіг хвороби та відсутність стійкого імунітету, а тривала персистенція їх в організмі веде до розвитку вторинних імунодефіцитів та аутоімунних порушень[6-10].

З іншого боку, у багатьох публікаціях [2,5,8,9] передбачається, що активізація персистентних інфекцій у вагітних обумовлена посиленням загальної та локальної супресивної активності, направленої на становлення та підтримку імунної

толерантності материнського організму по відношенню до плода. Одним з найважливіших регуляторних цитокинів, який в значній мірі визначає напрямок імунної відповіді, і під час вагітності зокрема, є інтерлейкін-10 (ІЛ-10), під його впливом пригнічується клітинний імунітет, який регулюється Т-хелперами 1-го типу і стимулюється гуморальна відповідь з участю Т-хелперів 2-го типу, що власне і є необхідною умовою нормального протікання вагітності [5,10]. Зокрема, промоторна ділянка гена ІЛ-10 (пІЛ-10) містить ряд крапкових нуклеотидних варіацій, які відповідають за високу/низьку експресію ІЛ-10, ці ж SNP (single nucleotide polymorphism) формують алелі схильності до ряду захворювань, і особливо аутоімунних. Найбільш дослідженими є SNP -1082 G →A, -819 T→C та -592 A→C [11].

Отже, виходячи з вище сказаного, метою роботи було вивчення стану клітинного імунітету, особливостей розподілу поліморфних варіантів SNP -1082 G →A промоторної ділянки гена ІЛ-10 у жінок з навиковим невиношуванням вагітності на ранніх термінах під кутом зору сприйнятливості їх до уrogenітальних інфекцій.

### **Матеріал і методи**

Всього обстежено 289 жінок з навиковим невиношуванням вагітності (ННВ) при 2-х і більше самовільних викиднях у I триместрі вагітності в анамнезі. На час обстеження жінки не були вагітними. Діагностика уrogenітальних інфекцій TORCH – комплексу проводилася при використанні методу ПЛР – полімеразної ланцюгової реакції (метод генодіагностики) за допомогою наборів ф-ми «ИнтерЛабСервис», Москва, РФ. Для досліджень використовували епітеліальні клітини, отримані за допомогою зішкрібу вагінальними щіточками із цервікального каналу. Імунофенотипування лімфоцитів периферійної крові проводили за допомогою моноклональних антитіл (в-во І-ту імунології АМН, Москва, РФ) непрямым імунофлюоресцентним методом забарвлення клітин в моношарі. Імунологічно обстежено 44 жінки із репродуктивними втратами у I -му триместрі вагітності. Контролем слугували жінки із здоровими дітьми (33 жінки). Досліджувану промоторну ділянку гена ІЛ-10, що містить SNP 1082-G→A ампліфікували за допомогою полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР) згідно методу, описаного Giordani L. at al. [12] з використанням реактивів “МВІ Fermentas”. Детекцію SNP – 1082 G→A проводили методом ПДРФ з використанням ендонуклеази рестрикції Eam1401 (“МВІ Fermentas”) згідно інструкцій фірми-виробника. Фрагменти ПЛР- продукту, отримані методом ПДРФ, розділяли у агарозному гелі (3%, 0,5 мг бромистого етидію). Всього обстежено 100 осіб. Контроль склав 73 особи без обтяженого анамнезу. Отримані дані піддавались обробці методами варіаційної статистики: визначали критерій Пірсона  $\chi^2$ [13].

### **Результати та обговорення**

Проводили ДНК – діагностику наступних уrogenітальних інфекцій: Chlamydia trachomatis, Ureaplasma urealiticum, Mycoplasma hominis, HSV-2 (генітального герпесу), CMV (цитомегаловірусу), Toxoplasma gondii. Найчастіше при ННВ діагностувалася Ureaplasma urealiticum, її частота складала 56,4%, Mycoplasma hominis зустрічалася із частотою 18,6%, Chlamydia trachomatis – 11,3%. Рідше зустрічалися вірусні ураження, зокрема частота CMV складала 11%, а HSV-2 – 7,3%. Toxoplasma gondii діагностована у 3,4% обстежених жінок.

Підсумовуючи цей розділ роботи, слід зазначити, що частота інфікування інфекціями TORCH – комплексу є значною і назагал сягає 58% в групі жінок із ННВ, по структурі вона не відрізняється від групи жінок із первинним непліддям і вірогідно відрізняється у порівнянні із групою жінок із завмиранням вагітності в сенсі суттєво вищої частоти вірусних уражень цитомегаловірусною та герпетичною інфекціями.

Очевидним, на нашу думку, є те, що реакції-відповіді на інфекції є різними у різних жінок, враховуючи генетичну і, відповідно, імунну індивідуальність кожного організму. Тобто, більш повне розуміння унікальності кожного організму-господаря

приведе до розробки більш точних індивідуальних програм лікування та підвищить якість протидії хворобам жіночого статевого тракту, і як наслідок, дозволить запобігти репродуктивним втратам. Відповідно, наступним етапом даної роботи було вивчити стан клітинного імунітету у жінок з ННВ під кутом зору інфікування їх урогенітальними інфекціями. В дослідженнях використовувалися наступні моноклональні антитіла: CD3, CD4, CD8, DR, CD19, CD20, CD16, за допомогою котрих визначали субпопуляції лімфоцитів.

Отримані результати засвідчили, що при навиковому невиношуванні вагітності імунотипічний профіль вказує на занижений рівень В-клітинних маркерів. Зокрема, виявлено достовірно нижчий рівень експресії CD20-рецепторів. Такі зміни можуть свідчити про порушення механізмів продукції антитіл. Привертає увагу, також, занижений Т-хелперів/індукторів (CD4) при нормальній експресії Т-супресорів/цитотоксичних (CD8). Вказані імунорегуляторні Т-лімфоцити є важливою ланкою клітинного імунітету. Так, Т-хелпери/індуктори є допоміжними клітинами для В-лімфоцитів. Вони є головними індукторами в імунних реакціях, допомагають В-лімфоцитам у взаємодіях з Т-клітинозалежними антигенами.

Таким чином, в патогенезі ННВ не останню роль відіграють імунні механізми. Інфекційні агенти, на нашу думку, лише посилюють цей розбалансований імунорегуляторний процес. Підтвердженням висунутих припущень можуть бути результати інших дослідників [5], які в групі жінок з навиковим невиношуванням вагітності нез'ясованого генезу рекомендують проводити імунотерапію.

Одним з найважливіших регуляторних цитокінів, який в значній мірі визначає напрямок імунної відповіді є інтерлейкін-10, а його експресія великою мірою обумовлюється генотипом «високої», «помірної», чи «низької» експресії ІЛ-10. Відповідно, наступним етапом роботи було вивчення розподілу та частоти алелей низької (А) та високої (G) експресії гена ІЛ-10 та генотипів, які вони формують (AA-генотип «низької» експресії, GG-генотип «високої» експресії та AG-генотип «помірної» експресії в групі жінок з ННВ.

Отримані результати засвідчили, що співвідношення частот А- та G- алелей (всього обстежено 100 жінок, або 200 алелей) становило 82 : 118 (в абсолютних значеннях), або 41% до 59% алелей. Таким чином, обстежувана група жінок з ННВ характеризується підвищеною частотою алелі G (59%) SNP -1082 G→A, тобто алелі високої експресії гена ІЛ-10 в порівнянні з алеллю А (41%) – низька експресія гена ІЛ-10. Далі було проведено аналіз розподілу та частот генотипів SNP – 1082 G→A пІЛ-10, в результаті якого показано, що в обстежених осіб з групи подружніх пар з ННВ з найвищою частотою (46%) зустрічається генотип високої експресії гена ІЛ-10, а саме GG-генотип. Генотип низької експресії гена ІЛ-10, тобто AA-генотип, зустрічається з частотою 28%, а частота генотипу помірної експресії (AG-генотип) становить 25%. В той час, як в контрольній групі найвищою частотою характеризується генотип помірної експресії (AG-генотип), а найнижчою – генотип високої експресії (GG-генотип). Статистичне опрацювання отриманих результатів з використанням критерію Пірсона  $\chi^2$  показало вірогідно значиме зростання частоти GG-генотипу ( $\chi^2=12$ ,  $p<0,01$ ), який асоціюється з високою експресією гена ІЛ-10 в групі жінок з ННВ та вірогідно значиме зменшення генотипу помірної експресії AG-генотипу ( $\chi^2=10,9$ ,  $p<0,01$ ). Наші дані принципово співпадають з результатами Daher із співавт. [14], які передбачають, що саме ІЛ-10 може бути задіяний в патогенезі навикового невиношування вагітності.

Отже, отримані результати дають підстави думати, що генотип високої експресії ІЛ-10 є негативним прогностичним маркером для нормального протікання вагітності. Передбачаємо, що ІЛ-10 задіяний в патогенезі репродуктивних втрат на ранніх термінах вагітності через генетично детермінований регуляторний вплив на порушення імунного статусу у жінки. Припускається, що імунні порушення у жінок є

первинними і такими, що сприяють їх ураженню уrogenітальними інфекціями, і як результат, навиковому невиношуванню вагітності.

#### **Висновки.**

1. Генодіагностика уrogenітальних інфекцій у групі жінок із навиковим невиношуванням вагітності показала 58-відсоткове інфікування інфекціями TORCH – комплексу.

2. В групі жінок з навиковим невиношуванням вагітності порушений механізм продукції антитіл із залученням імунорегуляторних Т-лімфоцитів.

3. В групі жінок з навиковим невиношуванням вагітності достовірно найвищою частотою володіє генотип високої експресії (GG-генотип) інтерлейкіну-10.

4. Передбачаємо, що первинні генетично обумовлені особливості імунного статусу жінок сприяють їх інфікуванню, і як результат, навиковому невиношуванню вагітності.

#### **Література**

1. *Старостина Т.А., Демидова Е.М., Анкирская А.С. и др.* Современные вопросы патогенеза и терапии невынашивания беременности // *Акуш. и гинекол.* – 2002. – №5. – С.61–63.
2. *Chou S.W.* Cytomegalovirus and its clinical implication // *Traspl. Infect. Dis.* – 2001. – vol.5, No. – P.20–24.
3. *Emmer P.M., Nelen W., Steegers E. Et al.* Peripheral natural killer cytotoxicity CD56posCD16pos cells increase during early pregnancy in women with a history of recurrent spontaneous abortion // *Hum. Reprod.* – 2000. – vol.15, P.1163–1169.
4. *Ntrivalas E.I., Kwak–Kim J.Y.H., Gilman–Sachs A. Et al.* Status of peripheral blood natural killer cells in women with recurrent spontaneous abortions and infertility of unknown aetiology // *Hum. Reprod.* – 2001. – vol.16. – P.855–861.
5. *Дранник Г.Н.* Клиническая иммунология и алергология. – Москва. – 2003. – 604 с.
6. *Сидорова И.С., Макаров И.О., Воеводин С.М.* Диагностика и лечение внутриутробной инфекции в различные периоды беременности // *Акуш. и гин.* – 2004. – №2. – С.40–45.
7. *Маричев І.Л.* TORCH-інфекції: сучасні аспекти діагностики // *Лаб. Діагн.* – 2003. – №4. – С.43–46.
8. *Гаспаров А.С., Летучих А.А., Хилькевич Е.Г., Флоров Б.С.* Современные методы диагностики и лечения уrogenітального хламидиоза // *Акуш. и гин.* – 2003. – №3. – С.59–60.
9. *Bodeus M., M. Van Rans, Bernard P. et al.* Anticytomegalovirus IgG avidity in pregnancy: a 2-year prospective study // *Fetal Diagn. Ther.* – 2002. – Vol.17, N6. – P.362–366.
10. *Mocellin S., Panelli M.C., Wang E., Nagorsen D., Marincola F.M.* The dual role of IL-10 // *Trends Immunol.* – 2003. – vol.24, №1. – P.36–43.
11. *Brenner S., Prosch S., Schenke–Layland K., Riese U., Gausmann U., Platzer C.* cAMP-induced interleukin-10 promoter activation depends on CCAAT/enhancer-binding protein expression and monocytic differentiation // *J.Biol.Chem.* – 2003. – vol.278, №8. – P.–5597–5604.
12. *Giordani L., Bruzzi P., Lasalandra C., Quaranta M., Schittulli F., Ragione F. D., Iolascon A.* Association of breast cancer and polymorphisms of Interleukin-10 and Tumor Necrosis Factor- $\alpha$  genes // *Clin. Chem.* – 2003. – vol.49. – P. 1664–1667.
13. *Певницкий Л.А.* Статистическая оценка ассоциаций HLA-антигенов с заболеваниями // *Вестник АМН СССР.* – 1988. – №7. – С.48–51.
14. *Daher S., Shulzhenko N., Morgun A., Mattar R., Rampim GF., Camano L., DeLima M.G.* Assotiations between cytokine gene polymorphisms and recurrent pregnancy loss // *J.Reprod. Immunol.* – 2003 – vol.58, No 1. – P.69–77.

#### **Резюме**

Вивчали стан клітинного імунітету, крапкові нуклеотидні поліморфізми промоторної ділянки гена ІЛ-10 у жінок з навиковим невиношуванням вагітності під

кутом зору сприйнятливості їх до уrogenітальних інфекцій. Встановлено, що дана група характеризується достовірно підвищеною частотою алелі G – алелі високої експресії та генотипу високої експресії ІЛ–10 (GG–генотип) та порушенням механізму продукції антитіл із залученням імунорегуляторних Т–лімфоцитів. Припускається, що імунні порушення у жінок є первинними і такими, що сприяють їх ураженню уrogenітальними інфекціями, і як результат, навиковому невиношуванню вагітності.

Изучали состояние клеточного иммунитета, точечные нуклеотидные полиморфизмы промоторного участка гена ИЛ–10 в группе женщин с привычным невынашиванием беременности с точки зрения восприимчивости их к уrogenитальным инфекциям. Установлено, что данная группа характеризуется достоверно повышенной частотой аллеля G – аллеля высокой экспрессии ИЛ–10 и генотипа высокой экспрессии (GG–генотип) и нарушением механизма продукции антител при вовлечении иммунорегуляторных Т-лимфоцитов. Допускаем, что иммунные нарушения у женщин – первичные и такие, что способствуют инфицированию уrogenитальными инфекциями, и как результат, привычному невынашиванию беременности.

Studied the condition of the cellular immunity and the SNP1082 G→A of the gene IL–10 promotor region in women with recurrent miscarriage with a view of their sensitivity to the urogenitalic infections. As a result of studying was determined statistically significant increase of both IL–10 high expression allele frequency (G–allele) and IL–10 high expression genotype frequency (GG–genotype). Studied the condition of the cellular immunity in women with recurrent miscarriage with a view of their sensitivity to the urogenitalic infections. It is established that women with recurrent miscarriage have the infringement of the antibody production mechanism. It is supposed, that immunological disfunction in women are prioritive and such that help their perception by urogenitalic infections and as a result this urogenitalic infections is the recurrent miscarriage.

**КРАСНОВ М.С., \*СМУТОВА В.А., \*\*МАРГАСЮК Д.В., \*\*БЕРЕЗИН Б.Б., \*\*БИТКО С.А., ЯМСКОВА В.П., \*\*ЯМСКОВ И.А.**

*Учреждение российской академии наук Институт биологии развития им. Н.К. Кольцова РАН, Россия, 119334, Москва, ул. Вавилова, 26, e-mail: [embrmsk@mail.ru](mailto:embrmsk@mail.ru)*

*\*Московский Государственный Университет им. М.В. Ломоносова, Биологический факультет, Россия, 119991, Москва, Воробьевы горы, 1*

*\*\*Учреждение российской академии наук Институт элементоорганических соединений им. А.Н. Несмеянова РАН, Россия, 119991, Москва, ул. Вавилова, 28*

## **ИДЕНТИФИКАЦИЯ И АКТИВНОСТЬ В СВЕРХМАЛОЙ ДОЗЕ БИОРЕГУЛЯТОРА, ВЫДЕЛЕННОГО ИЗ СЕМЕННИКОВ КРЫС.**

Бесплодие у мужчин возникает в результате разнообразных патологических процессов в организме, оказывающих отрицательное воздействие на внутренние органы, эндокринные железы, центральную нервную систему, приводя к дистрофическим изменениям в семенных канальцах и ткани яичка, способствуя при этом ухудшению оплодотворяющей способности сперматозоидов. Поэтому поиск и разработка новых препаратов для стимуляции и поддержания сперматогенеза является актуальным вопросом современной медицины. Ранее в различных тканях позвоночных нами была обнаружена группа биорегуляторов, действующих в сверхмалых дозах (СМД) [Borisenko et al., 2007; Krasnov et al., 2007; Margasyuk et al., 2007; Nazarova et al., 2007; Yamskova et al., 2007a,b]. Данные биорегуляторы обладали способностью поддерживать и восстанавливать ткани после повреждения, стимулировать клеточную