

Національна академія наук України
Інститут молекулярної біології і генетики
Українське товариство генетиків і селекціонерів
ім. М.І. Вавилова

ФАКТОРИ ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЇ ЕВОЛЮЦІЇ ОРГАНІЗМІВ

**ФАКТОРЫ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЙ
ЭВОЛЮЦИИ ОРГАНИЗМОВ**

**FACTORS IN EXPERIMENTAL
EVOLUTION OF ORGANISMS**

Збірник наукових праць

Видається з 2003 р.

ТОМ 23

Присвячено

135-річчю від дня народження А.О. Сапєгіна

Київ – 2018

РЕДАКЦІЙНА КОЛЕГІЯ

Головний редактор **В.А. Кунах**

Заступник головного редактора **Н.М. Дробик**

І. В. Азізов (Азербайджан)	І.С. Карпова	М.А. Пілінська
А. Атанасов (Болгарія)	А. В. Кільчевський (Білорусь)	В.Г. Радченко
Я.Б. Блюм	І.А. Козерецька	С.Ю. Рубан
Р.А. Волков	В.А. Кордюм	А.А. Сибірний
Т.К. Горова	О.І. Корнелюк	В.А. Сідоров (Україна–США)
Н.Г. Горovenko	М.В. Кучук	О.О. Созінов
В. А. Драгавцев (Росія)	Л.Л. Лукаш	Т.К. Терновська
О.В. Дубровна	С.С. Малюта	О.М. Тищенко
Г.В. Єльська	В.Г. Михайлов	Г.Федак (Канада)
	В.В. Моргун	

Відповідальний секретар – **М.З. Мосула**

Адреса редакції:

Інститут молекулярної біології і генетики НАНУ, вул. Акад. Заболотного, 150, Київ, 03680

e-mail: kunakh@imbg.org.ua http://www.utgis.org.ua

Editorial board

Editor-in-Chief **V.A Kunakh**

Deputy editor **N.M. Drobyk**

I. V. Azizov (Azerbaijan)	I.S. Karpova	M.A. Pilinska
A. Atanasov (Bulgaria)	A. V. Kilchevsky (Belarus)	V.G. Radchenko
Ya.B. Blume	I.A. Kozheritska	S.Yu. Ruban
R.A. Volkov	V.A. Kordium	A.A. Sibirny
T.K. Gorova	O.I. Kornelyuk	V.A. Sidorov (Ukraine–USA)
N.G. Gorovenko	N.V. Kuchuk	O.O. Sozinov
V. A. Dragavtsev (Russia)	L.L. Lukash	T.K. Ternovska
O.V. Dubrovna	S.S. Maliuta	O.M. Tyshchenko
A.V. El'ska	V.G. Mykhailov	G. Fedak (Canada)
	V.V. Morgun	

Responsible secretary – **M.Z. Mosula**

Editorial office address:

Institute of Molecular Biology and Genetics, National Academy of Sciences of Ukraine, 150,
Zabolotnogo street, Kyiv, 03680

e-mail: kunakh@imbg.org.ua http://www.utgis.org.ua

**Затверджено до друку рішенням вченої ради Інституту молекулярної біології
і генетики НАН України (протокол № 6 від 12 червня 2018 р.)**

Свідоцтво про державну реєстрацію друкованого засобу масової інформації
серія KB № 20936-10736ПР від 29.08.2014

Ф 18 **Фактори експериментальної еволюції організмів:** зб. наук. пр. / Національна академія наук України, Інститут молекулярної біології і генетики, Укр. т-во генетиків і селекціонерів ім. М.І. Вавилова; редкол.: В.А. Кунах (голов. ред.) [та ін.]. – К.: Укр. т-во генетиків і селекціонерів ім. М.І. Вавилова, 2018. – Т. 23. – 410 с. – ISSN 2415-3826 (Online), ISSN 2219-3782 (Print)

УДК 575.8+631.52+60](082)

©Українське товариство генетиків
і селекціонерів ім. М.І. Вавилова

- Дибков М.В., Степановський Ю.С., Чернишова Л.І., Волоха А.П., Гільфанова А.М., Бондаренко А.В., Ланій Ф.І., Дибкова К.М., Телегеев Г.Д. Молекулярно-генетична тест-система для діагностики спадкової гіпогаммаглобулінемії
- Дубровська Г.В., Онищенко К.В., Перета Л.В., Кашипарова О.В., Григоренко В.М., Скрипкіна І.Я. Мікросателітні зміни та метилування гена *RASSF1* у хворих на нирково-клітинний рак
- Козовий Р.В., Ковальчук Л.Є., Ерстенюк Г.М. Генетичні особливості функціонування глутатіонової системи у довгожителів Прикарпаття хворих на коморбідну патологію: артеріальну гіпертензію та остеоартроз
- Кочерга З.Р., Ковальчук Л.Є. Цитогенетичні аспекти нестабільності геному у новонароджених різних екологічних районів Івано-Франківської області
- Лукаш Л.Л. Восстановление целостности ДНК клеточными репаративными системами
- Мищук Я.М., Харківська Є.В., Серга С.В., Шкляр С.Є., Стаховський О.Є., Стаховський Е.О., Вітрук Ю.В., Кононенко А.А., Демидов С.В., Остапченко Л.І., Козерецька І.А. Асоціація поліморфізму Arg72Pro гена *TP53* (rs1042522) з ризиком розвитку раку сечового міхура в Україні
- Моїсєєнко Є.В., Розова К.В., Янчий Р.І. Аспекти дослідження багаторівневих механізмів адаптації людини до екстремальних умов Антарктики
- Ткач І.Р., Гулеюк Н.Л., Заставна Д.В., Сосніна К.О., Безкоровайна Г.М., Гельнер Н.В. Аналіз цитогенетичних досліджень ранніх репродуктивних втрат у залежності від віку матері
- Утевская О.М., Атраментова Л.А. Неравномерное распределение гаплогрупп Y-хромосомы в областных популяциях украинцев
- Утевская С.В., Гейко В.В. Половые особенности заболеваемости и течения экспериментального аутоиммунного энцефаломиелита у крыс под влиянием пренатального стресса
- Федота О.М., Садовниченко Ю.О., Рощенко Л.В., Воронцов В.М., Рижко П.П. Дослідження поширеності різних форм іхтіозу в Харківській області
- Чорна Л.Б., Макух Г.В., Заставна Д.В., Прокочук Н.В., Гельнер Н.В. Частота спадкових чинників тромбофілії серед жінок з навиковим невиношуванням вагітності
- 186 Dybkov M.V., Stepanovskyy Y.S., Chernyshova L.I., Volokha A.P., Hilfanova A.M., Bondarenko A.V., Lapiy F.I., Dybkova K.M., Telegiev G.D. Molecular genetic test system for diagnosis of x-linked agammaglobulinemia
- 192 Dubrovska H.V., Onyshchenko K.V., Pereta L.V., Kashparova O.V., Grygorenko V.M., Skrypki-na I.Ya. Microsatellite alteration and metylation of *RASSF1* gene in renal cell carcinoma
- 197 Kozoviy R.V., Kovalchuk L.Y., Erstenyuk H.M. Genetic features of the glutathyon system of long livers of Carpathian region with comorbid pathology: arterial hypertension and osteoarthritis
- 202 Kocherha Z.R., Kovalchuk L.Ye. Cytogenetic aspects instability to the genome in newborns from different ecological districts of Ivano-Frankivsk region
- 208 Lukash L.L. Renewing DNA integrity by cell repair systems
- 214 Mishchuk Ya.M., Kharkivska Ye.V., Serga S.V., Shklyar S.E., Stakhovskiy O.E., Stakhovskiy E.O., Vitruk Yu.V., Kononenko A.A., Demydov S.V., Ostapchenko L.I., Kozeretska I.A. Association of *TP53* Arg72Pro polymorphism (rs1042522) with bladder cancer risk in the Ukrainian population
- 219 Moiseyenko Y.V., Rozova K.V., Yanchiy R.I. Aspects of the study of multi-level mechanisms of human adaptation to the extreme conditions of Antarctica
- 226 Tkach I.R., Huleyuk N.L., Zastavna D.V., Sosni-na K.O., Bezkorovaina G.M., Helner N.V. Comparative cytogenetic analysis of early reproductive losses depending of maternal age
- 232 Utevska O.M., Atramentova L.A. Uneven distribution of Y-chromosome haplogroups in the regional populations of ukrainians
- 238 Utevska S.V., Geyko V.V. Prenatal stress-induced sex differences in the incidence and course of experimental autoimmune encephalomyelitis in rats
- 244 Fedota O.M., Sadovnychenko I.O., Roshchenyuk L.V., Vorontsov V.M., Ryzhko P.P. Study of prevalence of different forms of ichthyosis in Kharkiv region
- 249 Chorna L.B., Makukh H.V., Zastavna D.V., Prokopchuk N.M., Helner N.V. The frequency of genetic factors of thrombophilia in women with recurrent pregnancy losses

ДИБКОВ М.В.^{1✉}, СТЕПАНОВСЬКИЙ Ю.С.², ЧЕРНИШОВА Л.І.², ВОЛОХА А.П.², ГІЛЬФАНОВА А.М.², БОНДАРЕНКО А.В.², ЛАПІЙ Ф.І.², ДИБКОВА К.М.¹, ТЕЛЕГЄЄВ Г.Д.¹

¹ Інститут молекулярної біології і генетики НАН України,

Україна, 03680, м. Київ, вул. Академіка Заболотного, 150, e-mail: m.v.dybkov@imbg.org.ua

² Національна медична академія післядипломної освіти імені П.Л. Шупика,

Україна, 04209, м. Київ, вул. Богатирська, 30, e-mail: chin@nmapo.edu.ua

✉ m.v.dybkov@imbg.org.ua, (044) 526-07-29

МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧНА ТЕСТ-СИСТЕМА ДЛЯ ДІАГНОСТИКИ СПАДКОВОЇ ГІПОГАМАГЛОБУЛІНЕМІЇ

Мета. Первинні імунodefіцити – спадкові чи набуті внутрішньоутробно імунodefіцитні стани, які спричинено генетичними порушеннями. Спадкова гіпогамаглобулінемія (СГ) – це один із типів вроджених первинних імунodefіцитів людини, спричинений порушенням диференціації В-лімфоцитів. Брутон тирозинкіназа (ВТК) є ключовим регулятором дозрівання В-клітин, тому саме мутації гена ВТК призводять до спадкової гіпогамаглобулінемії. Їх виявлення є важливим для молекулярно-генетичного підтвердження діагнозу у хворих на СГ. **Методи.** Виділення РНК та ДНК, ЗТ-ПЛР та пряме двонаправлене секвенування за Сенгером. **Результати.** За допомогою запропонованої тест-системи було проведено аналіз зразків крові хворих на СГ. Показано, що запропонована тест-система дозволяє проводити первинний скринінг мутацій гена ВТК. **Висновки.** Створено і перевірено на клінічних зразках тест-систему для виявлення мутацій у хворих на спадкову гіпогамаглобулінемію, що базується на використанні зворотнотранскриптажної ПЛР та прямого двонаправленого секвенування. Цю систему запропоновано для проведення первинного скринінгу мутацій гена ВТК в Україні.

Ключові слова: спадкова гіпогамаглобулінемія, ВТК, мутації, первинні імунodefіцити.

Первинні імунodefіцити – спадкові чи набуті внутрішньоутробно імунodefіцитні стани, які спричинено генетичними порушеннями. Спадкова гіпогамаглобулінемія (СГ) (agammaglobulinemia, X-linked (XLA), X-зчеплена агаммаглобулінемія, агаммаглобулінемія Брутона, хвороба Брутона, МІМ #300755 [1]) – це один із типів вроджених первинних імунodefіцитів людини, спричинений порушенням диференціації

В-лімфоцитів. СГ виявляється тільки у хлопчиків (хоча було описано один випадок у дівчинки) в більшості випадків із другого півріччя життя у вигляді повторних бактеріальних інфекцій із формуванням хронічних вогнищ інфекції внаслідок глибокого дефіциту В-клітин та синтезу імунoglobulinів усіх класів. Частота захворювання складає 1–4 випадки на 1 000 000 осіб [2].

Спадкова гіпогамаглобулінемія була вперше описана в 1952 році полковником Огденом Брутоном (Ogden Carr Bruton) [3] у восьмилітнього хлопчика, в анамнезі якого часті пневмонії та інші синопульмонарні інфекції. Це був один із перших описаних імунodefіцитів людини. В цій роботі було як вказано причину захворювання – нестачу гамма-глобулінів, яку було виявлено новим на той час методом електрофорезу, так і вказано підхід до лікування цього захворювання – проведення замісної терапії за допомогою гамма-глобулінів шляхом ін'єкцій концентрованого імунoglobulinу донорської сироватки людини [3]. І за більш ніж 60 років цей підхід у лікуванні не зазнав докорінних змін, хоча, безумовно, нові препарати гамма-глобулінів і перехід на доведення введення значно покращили результати замісної терапії. Трансплантація кісткового мозку в разі успіху дозволяє повністю вилікувати хворого, однак високий ризик післяопераційних ускладнень не дозволяє рекомендувати цей метод без додаткових медичних показань. Останнім часом завдяки розвитку генноінженерних технологій розробляються підходи до індивідуальної генокорекції СГ, однак ці дослідження знаходяться на дуже ранній стадії.

Діагностика спадкової гіпогамаглобулінемії охоплює поєднання клінічних, лабораторних (у тому числі молекулярно-генетичних) критеріїв.

© ДИБКОВ М.В., СТЕПАНОВСЬКИЙ Ю.С., ЧЕРНИШОВА Л.І., ВОЛОХА А.П., ГІЛЬФАНОВА А.М., БОНДАРЕНКО А.В., ЛАПІЙ Ф.І., ДИБКОВА К.М., ТЕЛЕГЄЄВ Г.Д.

До основних клінічних критеріїв відносять:

- рецидивуючий синусит 1 – 2 рази на рік, хронічний синусит тривалістю більше 1 місяця, резистентні до терапії;
- рецидиви отиту 2 та більше разів на рік;
- рецидиви бактеріальних інфекцій бронхолегеневої системи: бронхіти, пневмонії (не менше 2 епізодів на рік);
- сепсис, остеомієліт;
- рецидиви інфекцій шкіри;
- персистуючі вірусні (ентеровірусні), паразитарні (лямбліоз) інфекції тощо;
- гіпоплазія лімфатичних вузлів, мигдаликів.

До основних лабораторних критеріїв відносять:

- знижену кількість В-клітин (за В-лімфоцитарними антигенами CD19 або CD20) < 2% (норма 8 – 19% або $0,19 - 0,38 \times 10^9/\text{л.}$);
- сироваткові імуноглобуліни IgG < 2 г/л, IgM, IgA, IgE відсутні або в дуже низькій концентрації (в нормі IgG – 7 до 16 г/л або 75 – 80% всіх Ig та 10 – 20% білка сироватки крові);
- відсутність ізогемаглютининів;
- відсутність імунологічної відповіді на імунізацію білковими (дифтерійний та правцевий анатоксини) та полісахаридними (*Haemophilus influenzae b*, *Streptococcus pneumoniae*) антигенами;
- відсутні плазматичні клітини (цитологічне дослідження кісткового мозку);
- кількість та функція Т-клітин, фагоцитів, системи комплементу – нормальна.

Для оптимізації клініко-лабораторного аналізу в Україні започатковано проект РАПД [4] (Раннє виявлення Первинних ІмуноДефіцитів) – багатоступеневий селективний скринінг пацієнтів із первинними імунодефіцитами, який виник із того, що в Україні, як і в багатьох інших, в т. ч. розвинених, країнах, виявляється набагато менше пацієнтів із первинними імунодефіцитами, ніж є насправді. За попередніми оцінками, в Україні не виявляється до 90% таких хворих. Тому проблема діагностики є вкрай важливою і актуальною. Це особливо важливо з огляду на те, що вчасна рання діагностика і своєчасне призначення замісної терапії з використанням сучасних препаратів гаммаглобуліну, які дозволяють досягти нормальної концентрації IgG у сироватці крові, дозволяє більшості хво-

ри на спадкову гіпоамаглобулінемію вести нормальне життя.

Молекулярні чинники спадкової гіпоамаглобулінемії.

У 1993 році кількома групами дослідників [5,6] було описано і локалізовано на довгому плечі Х хромосоми (Xq21.3-q22) ген *ВТК* (Брутон тирозинкіназа, Bruton agammaglobulinemia tyrosine kinase, MIM# 300300 [7]), який на момент відкриття мав назви *АТК* (agammaglobulinemia tyrosine kinase) та *ВРК* (B-cell progenitor kinase). 1994 року було показано, що саме білок ВТК є ключовим регулятором дозрівання В-клітин, а мутації гена *ВТК* і призводять до випадків спадкової гіпоамаглобулінемії [8]. Того ж року було доведено, що ген *ВТК* містить 19 екзонів і має довжину близько 37,5 т. п. н [9]. Білок ВТК (ЕС:2.7.10.2) налічує 659 амінокислотних залишків (76 кДа). Він належить до Тес нерцепторних тирозинкіназ і є незамінним для дозрівання В-лімфоцитів, диференціювання та сигналіngu. Білок містить 5 доменів: РН, Тес homology (ТН), Src homology 3 (SH3), SH2, та SH1 домени, останній зараз переважно називають каталітичним чи кіназним доменом [10].

Станом на 26 лютого 2018 року, згідно з міжнародною базою даних Shared database ВТК (Bruton tyrosine kinase), нараховується 855 мутацій гена *ВТК*, які описано в 1688 повідомленнях, що внесено до цієї бази даних [11]. Розподіл мутацій показує, що міссенс мутації складають до 40%, нонсенс – до 17%, делеції – до 20%, інсерції – 7%, мутації в сайтах сплайсингу – близько 16%. На жаль, не виявлено будь-яких мажорних мутацій, частота навіть найпоширеніших мутацій не перевищує 20%, тому для їхнього виявлення у хворих на СГ необхідно проводити аналіз послідовності всього гена або його кодууючої ділянки. Згідно із сучасними даними, мутації в гені *ВТК* спостерігаються у 85–90 % хворих на спадкову гіпоамаглобулінемію, тому молекулярно-генетична діагностика є як важливим критерієм підтвердження діагнозу, так і методом генеалогічного аналізу у сім'ях, обтяжених цим захворюванням.

Матеріали і методи

У роботі використовували (за інформованої згоди) зразки крові та букальних клітин пацієнтів із діагнозом спадкова гіпоамаглобулінемія, що знаходилися на обстеженні і лікуванні на кафедрі дитячих інфекційних хвороб та дитячої імунології Національної медичної академії

післядипломної освіти імені П. Л. Шупика, а також зразки РНК здорових донорів.

Для аналізу первинної послідовності мРНК *ВТК* (*Homo sapiens* Bruton tyrosine kinase (ВТК), transcript variant 1, mRNA, NM_000061.2) за допомогою зворотно-транскриптазної ПЛР (ЗТ-ПЛР) та прямого секвенування продуктів ПЛР було підібрано 10 пар специфічних праймерів (табл.) для гніздової двоетапної ампліфікації п'яти ділянок, що перекриваються і дозволяють повністю проаналізувати кодуєчу послідовність гена *ВТК*. Підбір праймерів було проведено за допомогою програми Genesinger 3.0.5 (freeware). Специфічність праймерів було додатково перевірено за допомогою онлайн-сервісів MFEprimer (<http://biocompute.bmi.ac.cn/CZlab/MFEprimer-2.0/>) та Primer-BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>).

ДНК виділяли з букальних клітин, які отримували за допомогою вимивання з порожнини рота за допомогою 3 мл 3% стерильного розчину сахарози. Клітини висаджували, промивали стерильним ізотонічним розчином і проводили виділення ДНК класичним методом лізису у присутності 1% ДСН та протеїнази К 18 год за 37°C з подальшою депротеїнізацією

сольовим методом (кінцева концентрація NaCl 1M). ДНК з супернатанту висаджували ізопропанолом і після промивання 70 % етанолом висушували і розчиняли у воді.

РНК виділяли з 5 мл венозної крові за Chomczynski, Sacchi [12] або з використанням методу із застосуванням гарячого фенолу [13]. Реакційна суміш для отримання кДНК містила буфер для зворотної транскриптази, 100 pmol d(N)₆, 1–2 мкг загальної РНК, 1mM dNTP, 10 од. інгібітора рибонуклеаз RNasin, 100–200 од. зворотної транскриптази M-MLV (Thermo Fisher Scientific) та воду (кінцевий об'єм – 30 мкл). Реакцію синтезу кДНК проводили 60 хв. за 42°C, прогрівали 10 хв. за температури 70°C, і аліквоти отриманої реакційної суміші (2 мкл) одразу використовували для проведення ПЛР, а решту зберігали за –20 – –80°C.

Перший етап ПЛР проводили з використанням п'яти пар праймерів: btk_13_e_f + btk_13_e_r; btk_4-8_f + btk_4-8_r; btk_914_z1_f + btk_914_z1_r; btk_1518_z1_f + btk_1518_z1_r; btk_19_z1_f + btk_19_z0_r (5 окремих ПЛР реакцій).

Таблиця. Склад олігонуклеотидних праймерів для проведення ЗТ-ПЛР аналізу

Назва	Нуклеотидний склад
btk_13_e_f	AACTGAGTGGCTGTGAAAGGG
btk_13_e_r	GTGAATCCACCGCTTCCTTAG
btk_13_i_f*	GGTTTGCTCAGACTGTCCTTC
btk_13_i_r*	TAAGGGAACCTTTCAATGATTG
btk_4-8_f	TGAGTATGACTTTGAACGTG
btk_4-8_r	CATAGTTACTAGGAATGTAGCC
btk_4-8_i_f*	TTGAGAAGATCACTTGTGTTG
btk_4-8_i_r*	TATCTCGTGCTCTCCACC
btk_914_z1_f	CATGCCAATGAATGCAAATG
btk_914_z1_r	CAGCTTCTCATGGGAAAGATTC
btk_914_e_f*	GAGGAAAGCAACTTACCATG
btk_914_e_r*	AGATTCATCATGACTTTGGC
btk_1518_z1_f	ACGTGGCCATCAAGATGATC
btk_1518_z1_r	TATTGGCGAGCTCAGGATTC
btk_1518_e_f*	ATTCATTGAAGAAGCCAAAG
btk_1518_e_r*	TCCATGACATCTAGAATATTGC
btk_19_z1_f	GGGAAGATGCCATATGAGAG
btk_19_z0_r	GACTTTCAAGCTTTCTAGTA
btk_19_e_f*	CTAACAGTGAGACTGCTGAACAC
btk_19_e_r*	CCCTCCCATCTTTATGACAC

Примітка. * – Праймери для проведення другого етапу гніздової ПЛР.

Аліквоту продуктів ПЛР візуалізували в 1,5% агарозному гелі. Оскільки кількість мРНК ВТК у хворих значно нижча, аніж у здорових донорів, у разі необхідності проводили другий етап гніздової ПЛР з внутрішніми парами праймерів (табл.). Аліквоти продуктів ПЛР візуалізували, а решту очищали і піддавали прямому двонаправленому сиквенуванню за Сенгером.

Результати та обговорення

Традиційний підхід виявлення мутацій у гені *ВТК* полягає в аналізі зразків ДНК за допомогою ПЛР із подальшим прямим двонаправленим сиквенуванням за Сенгером ампліфікатів усіх 19 екзонів. Попри певні переваги (аналіз ДНК замість РНК (тобто значно менші вимоги до забору та зберігання зразків до проведення аналізу, забір букальних клітин замість забору венозної крові), у цього підходу є і недоліки. Так, за аналізу зразків ДНК не може бути виявлено сплайс-форми гена *ВТК*, хоча подібні форми неодноразово описані раніше і складають до 16% від загального числа всіх мутацій [11]. За аналізу ж мРНК *ВТК* ці мутації буде зареєстровано. Окрім того, за ЗТ-ПЛР та прямого сиквенування можна визначити первинну послідовність, скоротивши кількість ампліфікатів з 19 до 5 і, відповідно, необхідне проведення лише 10 реакцій сиквенування за Сенгером проти 38 за класичного підходу. Збільшення вартості аналізу, яке викликано необхідністю отримання РНК та кДНК, компенсується тим, що для більшості пацієнтів проводиться аналіз на супутні інфекції, в тому числі на РНК-вірусні, для виявлення яких також потрібно виділяти РНК та проводити реакцію зворотної транскрипції.

Виходячи з цього, нами було запропоновано тест-систему, що базується на аналізі зразків хворих за допомогою зворотно-транскриптазної полімеразної ланцюгової реакції з використанням п'яти пар праймерів (табл.), які дозволяють повністю проаналізувати кодуючу частину гена *ВТК* за допомогою прямого двонаправленого сиквенування отриманих ампліфікатів за Сенгером.

На першому етапі дослідження для перевірки створеної тест-системи нами було проаналізовано зразки РНК здорових донорів. Аналіз цих зразків показав, що вже після першого етапу ПЛР кількість ампліфікатів достатня для проведення прямого сиквенування, а отримані послідовності повністю відповідають прогнозованим.

На другому етапі ми перевірили систему

(за інформованої згоди) на зразках крові хворих на спадкову гіпоамагглобулінемію, генетичні порушення у яких було визначено у попередніх дослідженнях за допомогою класичного методу поекзонного сиквенування зразків ДНК. Оскільки відомо, що ген *ВТК* експресується переважно в В-клітинах, а саме їх кількість сильно редукована у хворих на СГ, і цей ген не експресується в Т-клітинах, ми очікували, що це може вплинути на кількість продуктів ПЛР. І дійсно, після першого етапу ПЛР, навіть якщо ампліфікати візуалізувалися на електрофорезі, кількість продукту (в більшості випадків) була недостатньою для проведення прямого сиквенування. Для вирішення цієї проблеми ми застосували метод гніздової ПЛР, тобто проводили другий етап ПЛР із внутрішніми парами праймерів (табл.), використовуючи в якості матриці аліквоту відповідних продуктів першого етапу ПЛР. І дійсно, після другого етапу ПЛР було отримано відповідні ампліфікати в кількостях, достатніх для подальшого сиквенування аналізу. Аналіз зразків крові пацієнтів із достаменно відомими генетичними аномаліями показав, що запропонований метод дозволяє виявити ці порушення і на рівні РНК. Таким чином, наш підхід дійсно дозволяє проводити виявлення мутацій у кодуючій частині гена *ВТК*.

Ми пропонуємо використання цієї тест-системи для аналізу зразків крові за первинного виявлення мутацій у хворих із підозрою на спадкову гіпоамагглобулінемію з метою виявлення специфічних мутацій. Наступний же генеалогічний аналіз за конкретно встановленою мутацією (окрім випадків сплайс-форм мутацій) буде проводитись із залученням традиційного аналізу послідовності ДНК конкретного екзону чи екзонів, оскільки це доцільніше з огляду на більш просту процедуру проведення аналізу та вартість такого дослідження.

Як згадувалося раніше, припускають, що в Україні до 90% спадкових імунodefіцитів не виявляється. Генетичний аналіз для цієї групи пацієнтів проводиться вибірково і переважно за кордоном. Тому видається вкрай необхідним впровадження молекулярно-генетичної діагностики саме в Україні. Це особливо важливо з огляду на те, що в разі вчасної ранньої діагностики і своєчасного призначення замісної терапії з використанням сучасних препаратів гаммаглобуліну у комплексі із наданням у разі потреби підтримуючої антибактеріальної терапії з використанням сульфамідів та антибіотиків дозволяє

більшості хворим на спадкову гіпоамаглобулінемію вести нормальне життя.

Висновки

Створено і перевірено на клінічних зразках тест-систему для виявлення мутацій у хво-

рих на спадкову гіпоамаглобулінемію, що базується на використанні зворотно-транскриптазної ПЛР та прямого двонаправленого секвенування. Цю систему запропоновано для проведення первинного скринінгу мутацій гена *BTK* в Україні.

Література

1. # 300755 AGAMMAGLOBULINEMIA, X-LINKED; XLA. *OMIM database* (ed at the McKusick-Nathans Institute of Genetic Medicine, Johns Hopkins University School of Medicine). URL: <http://www.omim.org/entry/300755> (дата звернення: 28.02.2018).
2. Sideras P., Smith C.I. Molecular and cellular aspects of X-linked agammaglobulinemia. *Adv Immunol.* 1995. Vol. 59. P. 135–223.
3. Bruton O.C. Agammaglobulinemia. *Pediatrics.* 1952. Vol. 9. P. 722–728.
4. Проект РАПІД Всеукраїнської асоціації дитячої імунології при кафедрі дитячих інфекційних хвороб та дитячої імунології НМАПО імені П.Л. Шупика. URL: <http://vadi.org.ua/rapid> (дата звернення: 28.02.2018).
5. Vetrie D., Vorechovsky I., Sideras P., Holland J., Davies A., Flinter F., Hammarstrom L., Kinnon C., Levinsky R., Bobrow M., Smith C.I.E., Bentley D.R. The gene involved in X-linked agammaglobulinaemia is a member of the src family of protein-tyrosine kinases. *Nature.* 1993. Vol. 361, No. 6409. P. 226–233.
6. Vorechovsky I., Zhou J.N., Vetrie D., Bentley D., Bjorkander J., Hammarstrom L., Smith C.I.E. Molecular diagnosis of X-linked agammaglobulinaemia. *Lancet.* 1993. Vol. 341. P. 1153.
7. * 300300 BRUTON AGAMMAGLOBULINEMIA TYROSINE KINASE; BTK. *OMIM database* (ed at the McKusick-Nathans Institute of Genetic Medicine, Johns Hopkins University School of Medicine). URL: <http://www.omim.org/entry/300300> (дата звернення: 28.02.2018).
8. Vihinen M., Vetrie D., Maniar H.S., Ochs H.D., Zhu Q., Vorechovsky I., Webster A.D.B., Notarangelo L.D., Nilsson L., Sowadski J.M., Smith C.I.E. Structural basis for chromosome X-linked agammaglobulinemia: a tyrosine kinase disease. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1994. Vol. 91, No. 26. P. 12803–12807.
9. Rohrer J., Parolini O., Belmont J.W., Conley M.E. The genomic structure of human BTK, the defective gene in X-linked agammaglobulinemia. *Immunogenetics.* 1994. Vol. 40, No. 5. P. 319–324.
10. Hendriks R.W., Bredius R.G., Pike-Overzet K., Staal F.J. Biology and novel treatment options for XLA, the most common monogenetic immunodeficiency in man. *Expert Opin Ther Targets.* 2011. Vol. 15, No. 8. P. 1003–1021. doi: 10.1517/14728222.2011.585971.
11. Shared database BTK (Bruton tyrosine kinase) LOVD v.3.0 Build 20c Curators: G.C.P. Schaafsma and M. Vihinen URL: <https://databases.lovd.nl/shared/genes/BTK> (дата звернення: 28.02.2018).
12. Chomczynski P., Sacchi N. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Analyt. Biochem.* 1987. Vol. 162, No. 1. P. 156–159.
13. Ribaldo R. Preparation of RNA from Tissues and Cells. *Current Protocols in Immunolog.* 2001. UNIT 10.11.1. doi: 10.1002/0471142735.im1011s04.

References

1. # 300755 AGAMMAGLOBULINEMIA, X-LINKED; XLA. *OMIM database* (ed at the McKusick-Nathans Institute of Genetic Medicine, Johns Hopkins University School of Medicine). URL: <http://www.omim.org/entry/300755>.
2. Sideras P., Smith C.I. Molecular and cellular aspects of X-linked agammaglobulinemia. *Adv Immunol.* 1995. Vol. 59. P. 135–223.
3. Bruton O.C. Agammaglobulinemia. *Pediatrics.* 1952. Vol. 9. P. 722–728.
4. RAPID Project (ed by Ukrainian Association of Paediatric Immunology & Dept of Paediatric Infectious Diseases and Paediatric Immunology of Shupyk National Medical Academy of Postgraduate Education) URL: <http://vadi.org.ua/rapid> (Last accessed: 28.02.2018).
5. Vetrie D., Vorechovsky I., Sideras P., Holland J., Davies A., Flinter F., Hammarstrom L., Kinnon C., Levinsky R., Bobrow M., Smith C.I.E., Bentley D.R. The gene involved in X-linked agammaglobulinaemia is a member of the src family of protein-tyrosine kinases. *Nature.* 1993. Vol. 361, No. 6409. P. 226–233.
6. Vorechovsky I., Zhou J.N., Vetrie D., Bentley D., Bjorkander J., Hammarstrom L., Smith C.I.E. Molecular diagnosis of X-linked agammaglobulinaemia. *Lancet.* 1993. Vol. 341. P. 1153.
7. * 300300 BRUTON AGAMMAGLOBULINEMIA TYROSINE KINASE; BTK. *OMIM database* (ed at the McKusick-Nathans Institute of Genetic Medicine, Johns Hopkins University School of Medicine). URL: <http://www.omim.org/entry/300300> (Last accessed: 28.02.2018).
8. Vihinen M., Vetrie D., Maniar H.S., Ochs H.D., Zhu Q., Vorechovsky I., Webster A.D.B., Notarangelo L.D., Nilsson L., Sowadski J.M., Smith C.I.E. Structural basis for chromosome X-linked agammaglobulinemia: a tyrosine kinase disease. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1994. Vol. 91, No. 26. P. 12803–12807.
9. Rohrer J., Parolini O., Belmont J.W., Conley M.E. The genomic structure of human BTK, the defective gene in X-linked agammaglobulinemia. *Immunogenetics.* 1994. Vol. 40, No. 5. P. 319–324.

10. Hendriks R.W., Bredius R.G., Pike-Overzet K., Staal F.J. Biology and novel treatment options for XLA, the most common monogenetic immunodeficiency in man. *Expert Opin Ther Targets*. 2011. Vol. 15, No. 8. P. 1003–1021. doi: 10.1517/14728222.2011.585971.
11. Shared database BTK (Bruton tyrosine kinase) LOVD v.3.0 Build 20c Curators: G.C.P. Schaafsma and M. Vihinen. URL: <https://databases.lovd.nl/shared/genes/BTK> (Last accessed: 28.02.2018).
12. Chomczynski P., Sacchi N. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Analyt. Biochem*. 1987. Vol. 162, No. 1. P. 156–159.
13. Ribaud R. Preparation of RNA from Tissues and Cells. *Current Protocols in Immunology*. 2001. UNIT 10.11.1. doi: 10.1002/0471142735.im1011s04.

DYBKOV M.V.¹, STEPANOVSKYY Y.S.², CHERNYSHOVA L.I.², VOLOKHA A.P.², HILFANOVA A.M.², BONDARENKO A.V.², LAPIY F.I.², DYBKOVA K.M.¹, TELEGEV G.D.¹

¹ Institute of Molecular Biology and Genetics of Natl. Acad. Sci. of Ukraine, Ukraine, 03680, Kyiv, Akad. Zabolotnogo str., 150, e-mail: m.v.dybkov@imbg.org.ua

² Shupyk National Medical Academy of Postgraduate Education, Ukraine, 04209, Kiev, Bogatyrskaya str., 30, e-mail: chinfa@nmapo.edu.ua

MOLECULAR GENETIC TEST SYSTEM FOR DIAGNOSIS OF X-LINKED AGAMMAGLOBULINEMIA

Aim. Primary immunodeficiencies are disorders in which immune system is missing or does not function normally due to genetic disorders. X-linked agammaglobulinemia (XLA) is a rare genetic disorder in which don't generate of mature B cells, which manifests as a complete or near-complete lack of proteins called gamma globulins, including antibodies, in their bloodstream. The BTK protein is the key regulator of β -cell maturation, so mutations in the BTK gene lead to hereditary agammaglobulinemia. Detection of mutations of the BTK gene is important for confirmation of the diagnosis in patients with XLA. **Methods.** DNA and RNA extraction, RT-PCR, direct Sanger sequencing of PCR fragments. **Results.** An analysis of blood samples from patients with XLA using a proposed test system was performed. It has been shown that the proposed test system allows for the initial screening of mutations in the BTK gene. **Conclusions.** The test system for the detection of mutations in patients with X-linked agammaglobulinemia, based on using of reverse transcriptase PCR and direct sequencing, was developed and tested on clinical samples. This system is proposed for the initial screening of BTK gene mutations in Ukraine.

Keywords: X-linked agammaglobulinemia, XLA, BTK, mutation, RT-PCR, primary immunodeficiency.