

7. Шехтман М. М. Руководство по экстрагенитальной патологии у беременных. — М., 1999. — 814 с.

8. Наказ МОЗ України № 620 від 29.12.2003 «Про організацію надання стаціонарної акушерсько-гінекологічної та неонатологічної допомоги в Україні». — К., 2003.

9. Вейн А. М., Авруцкий М. Я. Боль и обезболивание. — М.: Медицина, 1997. — 280 с.

10. Сидорова И. С. Физиология и патология родовой деятельности. — М.: МЕДпресс, 2000. — 320 с.

11. Сборник методик и тестов исследования вегетативного отдела нервной системы / Под ред. Ю. Л. Курако. — 2-е изд., перераб. и доп. — Одесса: ОГМУ, 1999. — 192 с.

12. Спосіб визначення вегетативного забезпечення фізичної діяль-

ності вагітних жінок (С. Р. Галич, І. А. Анчева, О. М. Пшемінська) / № 66293 А від 14.10.2003; 15.04.2004. — Бюл. № 4.

13. Спосіб визначення вегетативного забезпечення емоційної діяльності вагітних жінок (С. Р. Галич, І. В. Шпак, І. А. Анчева, Л. В. Дудченко, О. В. Долгушина) / № 2003043669 від 22.04.2003; № 13128/а від 19.06.2003.

УДК 618.145006.6036.22092084

В. Г. Дубініна^{1,2}, К. В. Літовкін², Т. Г. Вербицька², В. В. Бубнов², М. Г. Ануфрієв³

АНАЛІЗ -174G/C ПОЛІМОРФІЗМУ ПРОМОТОРНОГО РЕГІОНУ ГЕНА IL-6 У ХВОРИХ НА РАК ЕНДОМЕТРІЯ З ВИКОРИСТАННЯМ ТЕХНОЛОГІЇ ПІРОСЕКВЕНУВАННЯ

¹Одеський державний медичний університет,

²Науково-дослідний інститут регенеративної та реконструктивної біомедицини,

³Одеський обласний онкологічний диспансер

Інтерлейкін-6 є плейотропним цитокіном, який бере участь у низці фізіологічних і патофізіологічних процесів, у тому числі у формуванні запальної реакції, синтезі С-реактивного білка і канцерогенезі [1]. Даний глікопротеїн також відіграє важливу роль у репродуктивній фізіології, включаючи регуляцію стероїдної продукції яєчника і фолікулогенез [4]. Збільшення рівня даного цитокіну у сироватці звичайно супроводжує пухлинну прогресію при пухлинах голови, шиї, гортані, шлунка, печінки, підшлункової залози, кишечника, нирок, яєчника. Відзначено істотне підвищення рівня інтерлейкіну-6 у сироватці та перитонеальній рідині при ендометріозі, що корелює з прогресією захворювання [4]. Рівень інтерлейкіну-6 у сироватці може обумовлюватися -174G/C поліморфізмом у промоторній ділянці гена IL-6; звичайно він вище у

GG-гомозигот [2]. Виявлено вірогідну кореляцію між фенотиповим проявом раку яєчника й даним поліморфізмом: у С-гомозигот розвиток захворювання перебігав повільніше і результат захворювання був більш сприятливим порівняно з носіями G-алеля [4]. Таким чином, генетично зумовлене підвищення рівня інтерлейкіну-6 у сироватці може впливати на розвиток пухлинних захворювань жіночої репродуктивної сфери.

Метою даного дослідження було вивчення зв'язку між -174G/C поліморфізмом у промоторній ділянці гена IL-6 і схильністю до раку ендометрія.

Матеріали та методи дослідження

Отримана ДНК з 33 зразків ендометріальної тканини, з морфологічно верифікованою аденокарциномою ендометрія, переважно високо- та помірно

диференційованою, різних ступенів тяжкості. Робота проводилася за підтримки Одеського обласного онкологічного диспансеру. Як норму використовували ДНК, виділену з крові 27 здорових пацієнток. Для проведення молекулярно-генетичного аналізу було відібрано зразки венозної крові кількістю 5 мл. До 100–150 мг пухлинної тканини або до клітин з 1 мл крові додавали 1 мл STE, 1/10 об'єму 10%-го розчину SDS, EDTA до концентрації 50 ммоль та протеїназу К до кінцевої концентрації 50 мг/мл. Зразки інкубували при температурі 37 °С протягом 12 год, охолоджували та додавали 1/10 об'єму трьохмолярного розчину ацетату натрію й однаковий об'єм хлороформу, м'яко екстрагували на шейкері протягом 15–20 хв при 160 об./хв. Потім центрифугували 10 хв при 8000 об./хв. Верхню водну фазу двічі обробляли хлоро-



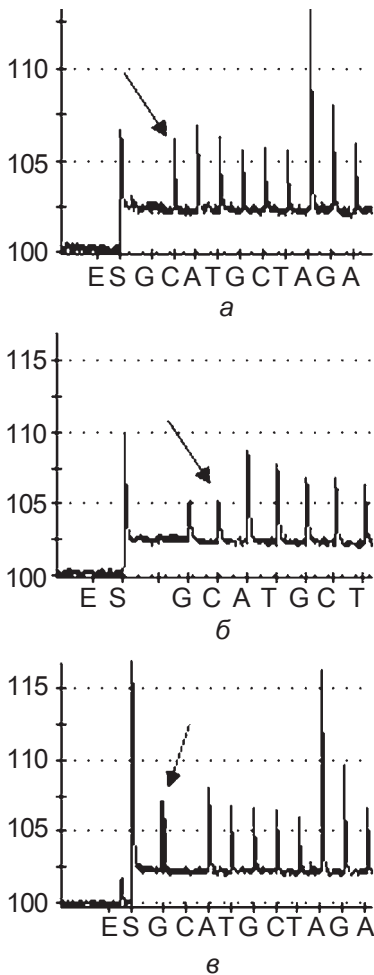


Рисунок. Результати піросеквенування промоторного регіону гена IL-6: а — CC-гомозигота; б — GC-гетерозигота; в — GG-гомозигота

формом. До водної фази додавали 2 об'єми 95%-го етанолу, інкубували 1 год при -20°C , потім центрифугували 10 хв при 8000 об./хв. Виділену ДНК промивали 500 мкл 70%-го етанолу та висушували при кімнатній температурі, потім розчиняли у 200 мкл буфера TE рН 7,6. Кількість та якість виділених препаратів ДНК оцінювали шляхом електрофорезу в агарозному гелі за допомогою системи відеодокументації Imago та спектрофотометрично (спектрофотометр Micro Wave-X, Biotech). Ампліфікацію фрагмента промоторного регіону IL-6 гена довжиною 111 пар нуклеотидів здійснювали з використанням 20–25 нг ДНК, 10 пмоль кожного з праймерів (прямий 5'-CGC TAG CCT CAA TGA C-3', зворотний 5'-GTG CCG AGG CTC

AGG CCG GGT GGG GCT GAT TGG AA-3', універсальний біотинильований 5'-ATC TGT GCC GAG GCT CAG GC-3') та 0,7 одиниці Taq-полімерази. Ампліфікацію було проведено у ПЛР-суміші (10 мМ трис-НСІ, рН 9,0, 1,5 мМ MgCl_2 , 50 мМ NaCl, 0,1 % Triton-X100, 0,01 % стабілізатора) об'ємом 25 мкл із використанням ампліфікатора iCycler (BioRad). Процес даної ампліфікації полягав у початковій денатурації ДНК при 95°C протягом 1,5 хв, 40 циклах ампліфікації (15 с при 95°C , 30 с при 55°C , 30 с при 72°C) та заключному етапі — 3 хв при 72°C . Піросеквенування було здійснено з використанням праймера 5'-CCC TAG TTG TGT CTT GGA A-3' на піросеквенаторі PSQ 96MA (Pyrosequencing AB) згідно з методикою, що запропонована Wieser et al. [4].

Результати дослідження та їх обговорення

У нашому дослідженні вперше в Україні було застосовано технологію піросеквенування. Процес піросеквенування, або секвенування послідовності ДНК за допомогою синтезу, складається з декількох ферментативних реакцій у одній пробірці, спрямованих на облік кількості неорганічного пірофосфату, що виділяється в результаті приєднання нуклеотидів до ланцюга ДНК, який синтезується [3]. Перетворення пірофосфату на АТФ в свою чергу приводить до перетворення присутнього у реакційній суміші люциферину на оксилуциферин, який виділяє кванти видимого світла у кількості, пропорційній кількості АТФ. Світло, що виділяється, відзначається піком на пірограмі, висота якого пропорційна кількості послідовно включених до ланцюжка ДНК, який синтезується, однакових нуклеотидів. На рисунку подано варіанти пірограм, отримані нами при піросеквенуванні ділянки промоторного регіону

гена IL-6. Праймер для піросеквенування було підібрано таким чином, щоб його 3'-кінець прилягав безпосередньо до поліморфного нуклеотиду у позиції -174, тому вже перших двох подавань у реакційну суміш дНТФ (відповідно G та C) було достатньо для ідентифікації алеля поліморфного нуклеотиду. У разі гомозиготності ДНК матриці (генотип GG або CC) на пірограмі спостерігалася поява відповідно G- (рис. 1, а) чи C-піка (рис. 1, в), висота яких пропорційна включенню у ланцюжок ДНК, який синтезується, одного дНТФ. При гетерозиготній матриці на пірограмі наявні як G-пик, так і C-пик (рис. 1, б) зі зниженою вдвічі висотою, оскільки половина матриць містила G-алель, а інша половина — C-алель (а точніше — комплементарні нуклеотиди), що призвело до зменшення виділюваного світлового сигналу у разі подавання в реакційну суміш певного дНТФ.

Проведений нами аналіз не виявив статистично вірогідних відмінностей у розподілі частот генотипів між групами, що вивчалися (контроль та хворі пацієнтки). C-алель, що знижує рівень інтерлейкіну-6 у сироватці, був присутній в обох групах приблизно з однаковою частотою: 0,46 у групі здорових жінок та 0,44 — у групі хворих пацієнток (таблиця). Як серед хворих, так і серед здорових пацієнток мали перевагу -174G/C гетерозиготи: 61,54 та 54,54 % відповідно. Отримані нами дані щодо співвідношення частот G та C-алелів збігаються з опублікованими раніше результатами популяційного аналізу -174 G/C поліморфізму в групах пацієнток з Центральної Європи та Північної Америки [4].

Висновки

Рак ендометрія має гетерогенну природу, що зумовлена взаємодією комплексу ендокринних елементів, молеку-



Порівняння частот генотипів і алелів, віддзеркалюючих -174G/C поліморфізм промотора IL-6 у групах здорових жінок (n=27) та хворих на рак ендометрія (n=33)

Генотип і алель	Частота		P
	Контрольна група, %	Група хворих, %	
Генотип			
GG	30,77	39,40	<0,95
GC	61,54	54,54	<0,95
CC	7,69	6,06	<0,95
Алель			
G	54,05	56,32	<0,95
C	45,95	43,68	<0,95

лярно-генетичних та інших факторів. До факторів, що впливають на пухлиноутворення в органах жіночої репродуктивної сфери, зараховують і поліморфізм у промоторному регіоні гена IL-6. Результати наших досліджень не підтвердили гіпотезу, згідно з якою -174G/C поліморфізм у промоторі даного гена визначає схильність до розвитку раку ендометрія. Проте це не означає, що така залежність взагалі не існує, оскільки ефекти інших генів можуть маскувати ефект даного поліморфізму. Тому далі передбачається провести дослідження впливу -174G/C поліморфізму у промоторній ділянці гена IL-6 на виникнення раку ендометрія з використанням значно більшої кількості пацієнтів та з урахуванням їхнього віку, типу харчування, шкідливих звичок тощо.

ЛІТЕРАТУРА

1. *An Interleukin-6 Gene Promoter Polymorphism Influences the Biological Phenotype of Ovarian Cancer* / L. A. Hefler, C. Grimm, S. Ackermann et al. // *Cancer Research*. — 2003. — Vol. 63. — P. 3066-3068.

2. *Interleukin-6 Promoter Haplotypes and Interleukin-6 Cytokine Responses* / F. A. Rivera-Chavez, D. L. Peters-Hybki, R. C. Barner, G. E.

O'Keefe // *Shock*. — 2003. — Vol. 20, N 3. — P. 218-223.

3. *Ronaghi M. Pyrosequencing sheds light on DNA sequencing* // *Genome Res.* — 2001. — Vol. 11, N 1. — P. 3-11.

4. *Analysis of an Interleukin-6 Gene Promoter Polymorphism in Women With Endometriosis by Pyrosequencing* / F. Wieser, G. Fabjani, C. Tempfer et al. // *J. Soc. Gynecol. Investig.* — 2003. — Vol. 10, N 1. — P. 32-36.

УДК 616.155.194.8-053.2:615.739.13

О. В. Зубаренко, К. О. Гурієнко, Н. Г. Лотиш, Н. В. Чекіна

СТАН ПЕРЕКИСНОГО ОКИСЛЕННЯ ЛІПІДІВ І ФЕРМЕНТІВ АНТИОКСИДАНТНОГО ЗАХИСТУ ПРИ ЗАЛІЗОДЕФІЦИТНІЙ АНЕМІЇ У ДІТЕЙ

Одеський державний медичний університет

Анемія — це патологічний стан, для якого характерне зниження вмісту гемоглобіну в одиниці об'єму крові (менше 110 г/л у дітей раннього та дошкільного віку та менше 120 г/л у школярів), часто у сполученні зі зменшенням кількості еритроцитів (менше $4,0 \cdot 10^{12}$ г/л) та гематокриту (нижче 35 %).

Залізодефіцитна анемія (ЗДА) — одна з найбільш частих форм анемії у дітей раннього віку і, за даними ВООЗ (2001), частота її постійно зростає [1]. У дітей ЗДА розви-

вається в результаті різних етіологічних факторів: дефіциту заліза, мікроелементів (ME) змінної валентності (Cu, Co, Zn, Se, Mn), дефіциту повноцінного харчування, що призводить до імунних порушень, змін ендокринних і адаптаційних механізмів, розвитку гіпоксії, порушення антиоксидантної регуляції та численних ускладнень [2; 3]. Комплекс функціональних і морфологічних змін при ЗДА, пов'язаний з порушенням метаболізму та системи антиоксидантного захисту

(АОЗ), є фактором ризику виникнення різної патології у дітей [1–3].

До сьогодні є недостатньо вивченими процеси формування таких ускладнень дефіциту заліза, як анемічний, сидеропенічний синдроми, механізми ушкодження органів та цілих систем в організмі дитини внаслідок гіпоксії та сидеропенії [2; 3]. Останнім часом з'явилися дані щодо синдрому метаболічної інтоксикації, який виникає внаслідок значного розбалансування обміну речо-

