

8. Кондрашова М. Н., Каминский Ю. Г., Маевский Е. И. Янтарная кислота в медицине. — Пущино, 1997. — 300 с.

9. Маевский Е. И., Розенфельд А. С., Гришина Е. В. Митохондрии, клетки и активные формы кислоро-

да. — Пущино, 2000. — С. 102-104.

10. Синевич О. Ю., Степнов М. И. Железодефицитная анемия у детей раннего возраста: некоторые аспекты метаболических нарушений, их медикаментозная коррекция // Пе-

диатрия. — 2002. — № 2. — С. 54-59.

11. Ткаченко С. К., Громнацька Н. М. Залізодефіцитна анемія в дітей — важлива проблема сьогодні // ПАГ. — 2002. — № 6. — С. 9-12.

УДК 618.14-006:575.22:577.213.3:616-008.63

В. Г. Дубініна, В. П. Доменюк, Т. Г. Вербицька, В. В. Бубнов

## ДОСЛІДЖЕННЯ МІКРОСАТЕЛІТНОЇ НЕСТАБІЛЬНОСТІ ГЕНОТИПІВ ХВОРИХ ІЗ МІОМОЮ МАТКИ

Одеський державний медичний університет

### Вступ

Трансформація нормальних клітин людини є наслідком нестабільності геному, що охоплює екзони, інтрони, а також кілька класів повторюваних послідовностей, серед яких найбільш практичним виявилось дослідження мінливості мікросателітної ДНК. Проявом мікросателітної нестабільності (microsatellite instability — MSI) є виникнення аберантного алеля мікросателітного маркера в результаті делеції або ампліфікації одного або декількох повторів, що його утворюють [1]. Накопичення таких змін у рецепторах факторів росту, транскрипційних і проапоптозних факторах, мембранних білках, регуляторах клітинного циклу (що кодуються такими генами, як TGFBR2, BAX, E2F4, IGFBP3, BLM, генами системи репарації hMSH3 і hMSH6) є основним молекулярним механізмом, за допомогою якого клітини з MSI набувають функціональних змін із можливою потенційною дією [2]. Показано, що мікросателітна нестабільність є наслідком інактивації генів системи репарації подинуклеотидів (mismatch

repair genes), переважно hMLH1 або hMSH2 в результаті гермінальних мутацій, що свідчить про високу ймовірність виникнення трансформуючих мутацій у цілому геномі та може бути додатковим маркером ризику розвитку злоякісної пухлини [3; 4]. Вперше феномен мікросателітної нестабільності виявлено у клітинах спадкового неполіпозного раку товстої кишки. Ушкодження генів hMSH2 і hMLH1 системи репарації виявлено більш ніж у 80 % пацієнтів зі спадковим раком товстої кишки (СРТК) і у 10–15 % хворих зі спорадичними карциномами товстої кишки, шлунка, молочної залози, легенів [5–7].

Висока мікросателітна нестабільність суттєво знижує толерантність пацієнта до хіміотерапії. Таким хворим потрібні альтернативні методи лікування, а хіміотерапія протипоказана [8]. Дослідження мікросателітів, найбільш чутливих до дефектів системи репарації, на наявність мікросателітної нестабільності геному дозволить виробити процедуру діагностики прогресування пухлини [1–8].

Огляд доступних літературних джерел свідчить про ретельне дослідження мікросате-

літної нестабільності у зв'язку з розвитком раку, тимчасом як практично невивченими залишаються геномні перебудови, що призводять до утворення доброякісних пухлин, серед яких в Одеському регіоні останнім часом переважають міоми.

**Метою** даної роботи є дослідження мікросателітної нестабільності генотипів хворих із міомою матки, а в подальшому — і створення ДНК-маркерів для діагностики та прогнозування виникнення, розвитку чи лікування міом.

### Матеріали та методи дослідження

Тканину міом і міометрія отримано від хворих із гінекологічного відділення 2-ї міської клінічної лікарні м. Одеси; ДНК виділено зі зразків від 15 хворих на міому матки. Для порівняння використовували ДНК, виділену з міометрія тих самих хворих. Зі зразків тканини за стандартною методикою фірми “Promega” набором “DNA purification kit” виділяли ДНК.

Кількість та якість виділених препаратів ДНК оцінювали з допомогою електрофорезу в агарозному гелі та спектрофотометрично.



Полімеразну ланцюгову реакцію (ПЛР) проводили в об'ємі 25 мкл із 14 парами SSR-праймерів (simple sequence repeat): E<sub>2</sub>F (хр. 20), BAX (хр. 21), TCF (хр. 18), C-MYC (хр. 8), WNT 1 (хр. 11), C-FES/FOS (хр. 15), DCC (хр. 18), P27 (хр. 6), THRA (хр. 17), APC (хр. 5), CYP19 (хр. 15), HS268YF5 (хр. 6), P53 (хр. 17), SHGC-10701 (хр. 6). За допомогою градієнтного блока ампліфікатора ICycler (Bio-Rad) для ПЛР розроблено умови гібридизації праймерів із матрицею ДНК і визначено концентрацію іонів Mg<sup>2+</sup> для реакції.

Візуалізацію продуктів ампліфікації виконували в агарозному та поліакриламідному гелях (8 %). Молекулярну масу фрагментів ампліфікації розраховували за допомогою комп'ютерної програми "Onedscan" згідно зі стандартом pUC18/MspI (501, 489, 404, 353, 242, 190, 147, 110, 89 п. н.). Статистичну обробку матеріалу виконано стандартними методами.

### Результати дослідження та їх обговорення

Серед 14 локусів, досліджених у роботі, неполіморфними виявилися чотири: E<sub>2</sub>F — 114–118 п. н., BAX — 147–147 п. н., TCF — 189–189 п. н., C-MYC — 128–128 п. н.

З двома парами праймерів (BCL, PTEN) не вдалося отримати виразних продуктів ампліфікації. Поліморфізм між генотипами хворих розпізнавали за допомогою 8 пар праймерів: WNT1, C-FES/FOS, DCC, P27, THRA, APC, CYP19, HS268YF5 (рис. 1).

За результатами детекції поліморфізму між генотипами розпочалося формування бази даних можливого алельного складу генотипів хворих із міомою матки в Одеському регіоні. При накопиченні суттєвої вибірки передбачається простежити асоціації певних алелів зі специфічними типами пухлин і в подальшому отримати маркери на різні типи

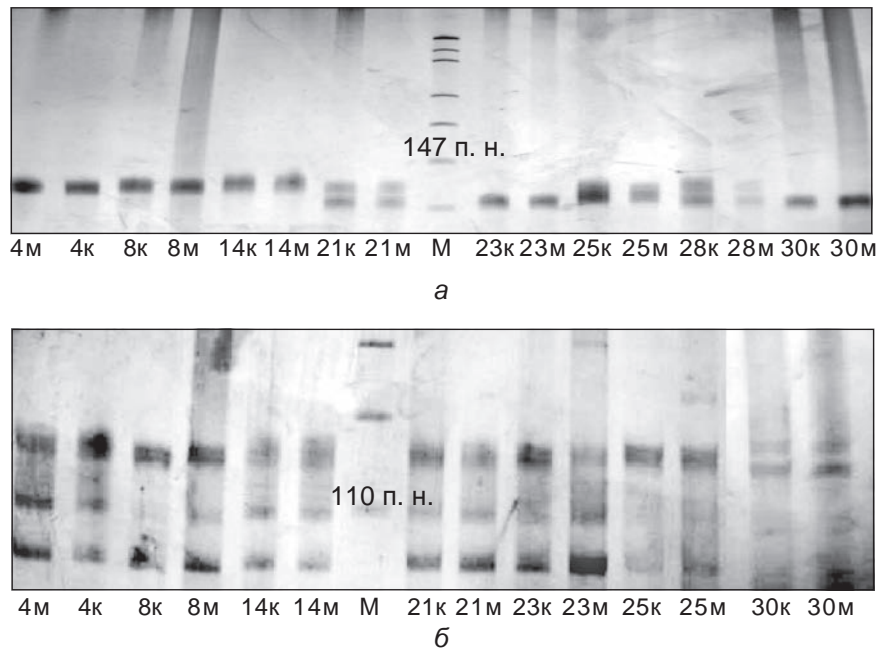


Рис. 1. Електрофореграми продуктів ампліфікації ДНК з SSR-праймерами: а — APC; б — THRA (цифрами позначено подвійні зразки хворих із міомою матки: м — ДНК з міоми; к — контрольна ДНК здорової тканини; М — маркер pUC18/MspI)

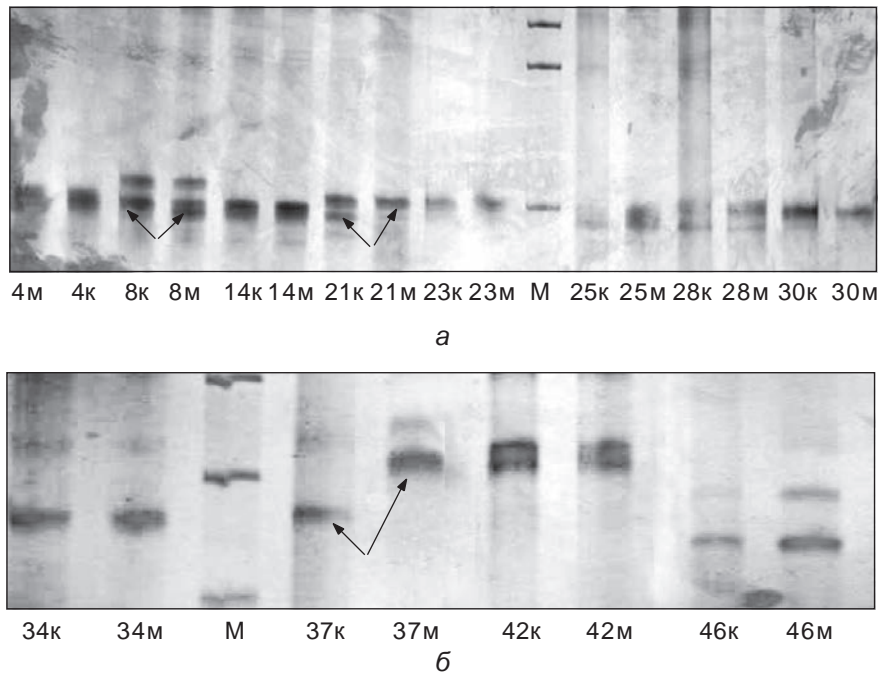


Рис. 2. Електрофореграми продуктів ампліфікації ДНК з SSR-праймерами: а — C-FES/FOS; б — DCC (цифрами позначено подвійні зразки хворих із міомою матки: м — ДНК з міоми; к — контрольна ДНК здорової тканини; М — маркер молекулярної маси pUC18/MspI; стрілками вказано варіанти поліморфізму в межах одного генотипу між пухлинною та здоровою тканинами)

міом. Детекція в популяції, наприклад алелів «схильності» до виникнення певного типу пухлини, дозволить перейти від діагностики захворювання до його прогнозування, запобігання. У разі лікування, знання особливостей носія певних

алелів дозволяє застосувати строго індивідуальну фармакотерапію.

Також детектовано варіанти поліморфізму між зразками пухлинної та здорової тканини в одному генотипі (в одній хворі людини) (рис. 2).



Характеристика SSR-локусів, досліджених у хворих із міомою матки

Показник	SSR локус												
	WNT1	C-FES/ FOS	DCC	P27	E <sub>2</sub> F	THRA	BAX	TCF	APC	CYP19	C-MYC	HS26 8YF5	
Кількість алелів	2	6	5	3	2	6	1	1	7	2	1	2	
Молекулярна маса, п. н.	139–143	232–252	175–209	305, 332, 366	114–118	115–134	147	189	103–131	115, 136	128	300–304	
Частота стривальності алелів, п. н. — %	max	244–46,7	175–53,3	366–100	114, 118–100	131–86,7	147–100	189–100	111, 115, 119–40	136–73,3	128–100	304–60	
	min	143–6,7	232–6,7	193, 209–6,7	305–20	115, 119, 123–6,7	–	–	103–6,7	115–26,7	–	300–13,3	
Поліморфізм між генотипами, %	0	33,3	26,7	13,3	0	33,3	0	0	40	6,7	0	6,7	
Поліморфізм у межах генотипу, %	13,3	20	26,7	60	0	6,7	0	0	0	0	0	0	

Узагальнені дані цього етапу роботи подаються в таблиці.

Найбільш поліморфним серед різних генотипів виявився локус APC (7 алелів) — супресор утворення пухлин, порушення якого пов'язані у більшості випадків із сімейним аденоматозно-поліпозним раком товстої кишки. Однак відсутність відмінностей у межах генотипу, за цим локусом, виключає ймовірність його участі у формуванні міом. Аналогічно виключаються локуси CYP19 і HS268YF5.

Більш інформативними виявилися локуси, поліморфні відносно зразків як одного, так і різних генотипів (гени-супресори пухлин P27, DCC, протонкоген C-FES/FOS, гомолог онкогену THRA). Вони відбивають природний поліморфізм популяції, і їхня дія пов'язана із формування саме міом. Цілком логічним є зв'язок локусів генів-супресорів, мінливість яких визначено через нестабільні мікросателітні послідовності, з наявністю міом, адже нові алелі можуть і не забезпечити функцію захисту організму від розвитку пухлин.

Встановлено кілька варіантів поліморфізму. Наприклад, локус DCC не містить алеля у міомі вузлової форми — 175–175 п. н., міометрій — 175–205 п. н.; наявність нового алеля у міомі — 201–201 п. н., міометрій — 175–175 п. н. Локус C-FES/FOS: наявність додаткового алеля в міомі — 236–240–252 п. н., міометрій — 240–252 п. н.; відсутність алеля в міомі — 244–244 п. н., міометрій — 236–244 п. н.; наявність нових алелів у міомі — 236–240 п. н., міометрій — 248–252 п. н. Слід відмітити, що такий варіант наявності нових алелів у міомі, інших, ніж алелі міометрія, спостерігався в генотипі однієї і тієї ж пацієнтки.

Найбільш поліморфним при порівнянні спектрів ДНК міоми та міометрію в межах зразка

виявився локус P27 (60 %), тимчасом як між зразками (генотипами) його інформативність становила лише 13,3 %. Зрозуміло, що збільшення цього співвідношення підвищує ймовірність участі певного локусу у формуванні міоми.

Локус Wnt, в якому детектовано поліморфізм лише в межах генотипу, цілком вірогідно пов'язаний зі шляхами формування пухлини, специфічними для окремої людини. Ця інформація є найбільш цінною, оскільки такий локус є тканинспецифічним маркером і може бути використаний для ранньої діагностики розвитку пухлин, для чого необхідно дослідити мінливість даного локусу в більшій вибірці, а також у хворих із різними типами пухлин.

#### Висновки

1. Встановлено нестабільність генотипів хворих на міому матки за вивченими мікросателітними локусами: максимальний поліморфізм між генотипами сягає 40 % (APC), у межах генотипу — 60 % (P27).

2. Близько 42 % досліджених локусів є поліморфними у

присутності пухлини в організмі пацієнта, але в той самий час за цими локусами різняться генотипи хворих, тобто проявляється природний поліморфізм популяції. Потрібно встановити асоціації таких варіантів поліморфізму з певними типами міом.

3. Виявлено тканинспецифічність алелів локусу Wnt, що дає можливість дослідити молекулярно-генетичні механізми розвитку міоми і можливі причини її виникнення. Отримана інформація є базовою для створення ДНК-маркерів прогнозування розвитку пухлини.

#### ЛІТЕРАТУРА

1. *Two modes of microsatellite instability in human cancer: differential connection of defective DNA mismatch repair to dinucleotide repeat instability* / S. Oda, Y. Maehara, Y. Ikeda et al. // *Nucleic Acid Research*. — 2005. — Vol. 33 (5). — P. 1628-1636.

2. *Microsatellite Instability in Colorectal Cancer: Considerations for Molecular Diagnosis and High-Throughput Screening of Archival Tissues* / M. Salto-Tellez, S. Lee, L. Chiu et al. // *Clin. Chem*. — 2004. — Vol. 50. — P. 1082-1086.

3. *Ricciardiello L., Goel A., Mantovani V.* Frequent loss of hMLH1 by

promoter hypermethylation leads to microsatellite instability in adenomatous polyps of patients with a single first-degree member affected by colon cancer // *Cancer Res*. — 2003. — Vol. 63. — P. 787-792.

4. *Microsatellite instability as indicator of MSH2 gene mutation in patients with upper urinary tract transitional cell carcinoma* / M. Roupret, J. Catto, F. Coulet et al. // *J. Med. Genet*. — 2004. — Vol. 41. — P. 91.

5. *Microsatellite instability as a prognostic factor in resected colorectal cancer liver metastases* / R. Haddad, R. Ogilvie, M. Croitoru et al. // *Annals of surgical oncology*. — 2004. — Vol. 11. — P. 977-982.

6. *Systemic chemotherapy induces microsatellite instability in the peripheral blood mononuclear cells of breast cancer patients* / F. Fonseca, A. Sant Ana, I. Bendit et al. // *Breast Cancer Res*. — 2005. — Vol. 7. — P. 28-32.

7. *Identification of D19S246 as a Novel Lung Adenocarcinoma Susceptibility Locus by Genome Survey with 10-cM Resolution Microsatellite Markers* / N. Yanagitani, T. Kohno, J. Kim et al. // *Cancer Epidemiology Biomarkers & Prevention*. — 2003. — Vol. 12. — P. 366-371.

8. *Ribic C., Sargent D., Moore M.* Tumor microsatellite-instability status as a predictor of benefit from fluorouracil-based adjuvant chemotherapy for colon cancer // *New England Journal of Medicine*. — 2003. — Vol. 349. — P. 247-257.

УДК 618.3-07;616.155.962.4

І. В. Каліновська

## ДОСЛІДЖЕННЯ РІВНЯ ПЛАЦЕНТАРНОГО $\alpha_1$ -МІКРОГЛОБУЛІНУ В МАТЕРИНСЬКІЙ СИРОВАТЦІ КРОВІ ПРИ ПЛАЦЕНТАРНІЙ ФОРМІ ФЕТОПЛАЦЕНТАРНОЇ НЕДОСТАТНОСТІ У РІЗНІ ТЕРМІНИ ВАГІТНОСТІ

Буковинський державний медичний університет, Чернівці

Плацентарна недостатність — основна причина хімічної гіпоксії та затримки внутрішньоутробного розвитку плода. Внутрішньоутробне страждан-

ня плода, зумовлене порушеннями обмінних процесів у фетоплацентарному комплексі, в 60–70 % випадків призводить до розладів нервово-психічно-

го розвитку немовлят у постнатальному періоді [1]. Передбачення ризику затримки внутрішньоутробного розвитку чи гіпоксії плода та їх своєчасна

