

# МОЛЕКУЛЯРНА БІОЛОГІЯ

УДК 616.33 – 006 : 611.018.7 : [ 616 – 052]

**О.В. Харченко**

Полтавський національний педагогічний університет імені В.Г. Короленка  
вул. Остроградського, 2, Полтава, 36003, Україна  
harchenko1957@rambler.ru

## **ЗМІНИ СЛИЗОВОЇ ОБОЛОНКИ ШЛУНКА, ЩО ВИЯВЛЕНІ ЗА ДОПОМОГОЮ МОЛЕКУЛЯРНО-БІОЛОГІЧНОГО МЕТОДУ У ПАЦІЄНТІВ, ХВОРИХ НА РАК ШЛУНКА**

*Серед численних маркерів, заснованих на використанні полімеразної ланцюгової реакції (PCR), особливе місце займають ті, що є фрагментами ДНК, що розташовані між локусами інвертних повторів ДНК, і відомі як ISSR (Inter simple sequence repeats). Використанню цих маркерів передувало відкриття того факту, що еукаріотні геноми в середньому на 30-90% представлені високополіморфними повторюваними послідовностями. Повторювана ДНК виконує своєрідну функцію з абсорбції мутацій. Насиченість геномів мікросателітними послідовностями є результатом дії багатьох факторів, серед яких одним із основних є рівень стабільності мікросателітної ДНК.*

*Інтенсивне подовження мікросателітних послідовностей за рахунок реплікаційних помилок має назву мікросателітної експансії. Більшість мікросателітних мутацій пов'язані з інсерціями або делеціями деяких повторів, що відбуваються під час реплікації. Таке порушення стабільності мікросателітів частіше всього відбувається завдяки утворенню петель на ДНК під час реплікації («slippage»). Характер і закономірності розподілення у геномі мікросателітів має особливий інтерес завдяки тій ролі, яку вони відіграють у розвитку онкологічних захворювань.*

*Проведена діагностика за допомогою реакції ISSR-PCR, яка показала зміни ДНК епітелію слизової оболонки, характерні для дисплазії епітелію різного ступеня тяжкості у слизовій оболонці шлунка пацієнтів, які хворіють на виразково-інфільтративний рак шлунка.*

*У випадках із указаними дисплазіями відбулися зміни у вигляді збільшення розмірів ампліконів, що є характерними ознаками малігнізації. Описані зміни мають характер мікросателітних експансій. Ампліфікаційні профілі периферичної крові пацієнтів, що не мали візуальних метастазів, дали позитивний результат у 27,8% випадків. Це вказує на здатність первинної пухлини до десимінації та ризик раннього метастазування.*

**Ключові слова:** ДНК, амплікони, фенотип.

**Вступ.** Основною причиною смерті в розвинених країнах, поряд із смертністю від серцево-судинних процесів і їх ускладнень, є смертність від злоякісних пухлин, кількість яких постійно зростає.

В Україні в 2009 р. рак шлунка займав третє (9,0%) місце у структурі онкопатології чоловіків і шосте (5,6%) місце у жінок; в структурі онкосмертності він посідає друге (11,8 і 9,3%) місце в обох групах. На сьогодні в Україні превалує метод діагностики раку шлунка «за принципом звертання», тому в 70% випадків діагностується розповсюджений пухлинний процес. У зв'язку з цим 5-річна виживаність хворих на рак шлунка не перевищує 13,8% у порівнянні з 50,0% в Японії [5, 6].

Відомо, що злаякісна трансформація має певні перебудови в геномі клітин, що, в свою чергу, може бути виявлено при аналізі геномної ДНК [3, 4].

Діагностика дисплазії епітелію слизової оболонки шлунка як передракової зміни є актуальною. Важка дисплазія характеризується клітинною атипією, анізокаріозом, гіперхроматозом ядер, різким збільшенням ядерно-цитоплазматичних співвідношень та розповсюдженою псевдостратифікацією. Середній вміст ДНК і число клітин у фазі синтезу різко підвищені [2, 3, 4].

Обов'язковим методом морфологічної діагностики злаякісних пухлин є гістологічний метод, але у вирішенні диференційно-діагностичної проблеми між дисплазією і раком шлунка його роздільної здатності недостатньо.

Полімеразна ланцюгова реакція (PCR) є універсальною технікою, яку активно використовують із середини 1980-х років. Серед численних маркерів, заснованих на використанні PCR, особливе місце займають ті, що є фрагментами ДНК, які розташовані між локусами інвертних повторів ДНК, – ISSR (Inter simple sequence repeats). Використанню цих маркерів передують відкриття того факту, що еукаріотні геноми в середньому на 30-90% представлені високополіморфними повторюваними послідовностями. Повторювана ДНК виконує своєрідну функцію з абсорбції мутацій в геномі [6].

Відносна насиченість геномів тими чи іншими мікросателітними послідовностями є результатом дії багатьох факторів, серед яких одним із найголовніших є рівень стабільності мікросателітної ДНК. Інтенсивне подовження мікросателітних послідовностей за рахунок реплікаційних помилок має назву мікросателітної експансії [7].

Більшість мікросателітних мутацій пов'язані з інсерціями або делеціями деяких повторів, що відбуваються під час реплікації. Таке порушення стабільності мікросателітів частіше всього відбувається завдяки утворенню петель на ДНК під час реплікації («slippage») [8].

Характер і закономірності розподілення у геномі мікросателітів має особливий інтерес завдяки тій ролі, яку вони відіграють у розвитку онкологічних захворювань [8, 10].

**Матеріали та методи дослідження.** В роботу покладено результати дослідження 50 спостережень слизової оболонки операційного матеріалу шлунків, що резеційовані через рак шлунка. Для дослідження брали зразки слизової оболонки шлунка з ознаками дисплазії різного ступеня, у якій вивчали зміни ДНК за допомогою полімеразної ланцюгової реакції (PCR) [8, 9].

Індивідуальне ДНК-типуння (генотипуння) зразків слизової оболонки шлунка проводили шляхом ампліфікації ДНК у PCR з використанням ISSR-праймеру S2, який мав структуру (AGC)<sub>6</sub>G [8].

Ампліфікацію проводили у 25 мкл реакційної суміші, що містила однократний реакційний буфер із трифосфатами, праймер наведеної структури, Таг-полімерази («Тапотілі», ВНДІ генетики, Росія). ДНК додавали у кількості 10-20 нг на реакцію. Температура відпалу праймера становила 57°C, синтез фрагментів ДНК проходив у 30 циклах ампліфікації на термоциклері (ампліфікаторі) «Терцик» ТП4-ПЦР 01 («ДНК-технологія», Росія) в режимі: I – 95° – 2 хв., II – 94° – 30 с, 57° – 2хв., 72° – 2 хв., III – 72° – 10 хв. Електрофоретичне розділення продуктів ампліфікації проводили у 2%-му горизонтальному агарозному гелі (Вагофор, Латвія) в однократному TBE-буфері з наступним їх фарбуванням протягом 10 хв в 0,5 мкг/мл розчині бромистого етидію і багаторазовою промивкою у проточній воді. Візуалізацію електрофореграм проводили на транслюмінаторі в ультрафіолетовому світлі з довжиною хвилі 365 нм із наступним фотографуванням. Визначення розмірів ампліконів виконували за допомогою маркера молекулярної маси 1000 вр DNA-Ladder, pUC 19 DNA/ Msp I («Fermentas», Литва) [1].

**Результати та їх обговорення.** Генотипуння епітелію слизової оболонки шлунка пацієнтів, хворих на виразково-інфільтративний рак шлунка, виявило досить стабільні ДНК-профілі, представлені експансією фрагментів розміром 520 та 620 п.н. (пар нуклеотидів) в усіх спостереженнях (рис. 2) і мали повну відмінність від профілю маркеру норми (рис. 1).

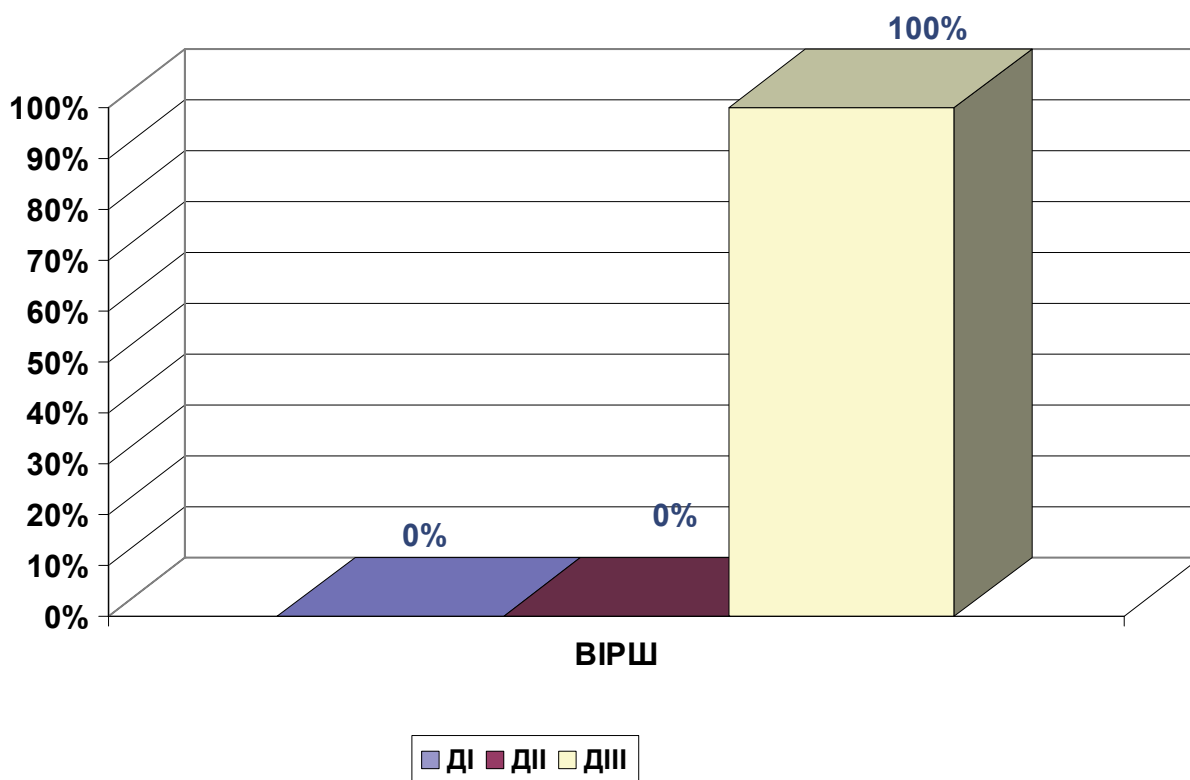
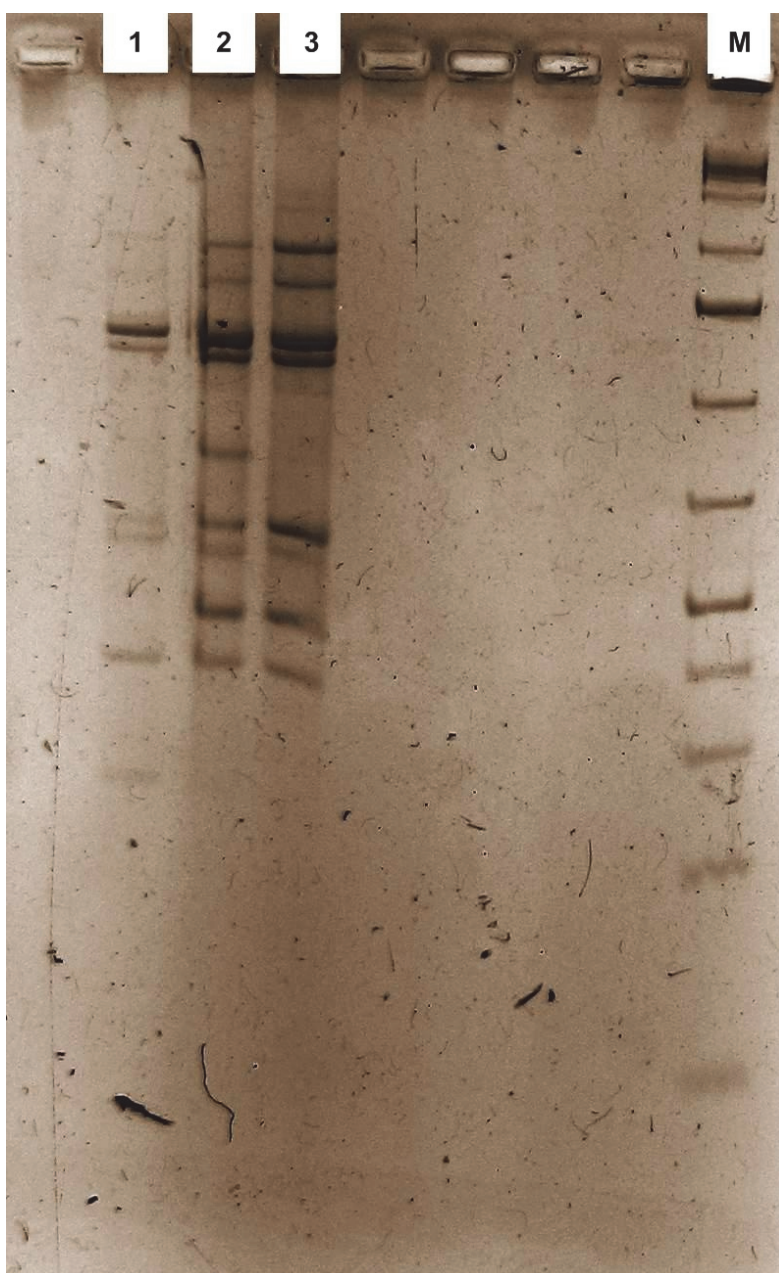


Рис. 1. Розподілення ДНК-профілів слизової оболонки шлунка у хворих на виразково-інфільтративний рак шлунка (ВІРШ).



*Рис. 2. Електрофореграми продуктів ампліфікату зразків ДНК слизової оболонки шлунка хворих на виразково-інфільтративний рак шлунка: 1, 2, 3 – ДНК-профілі, що відповідають маркеру пухлини; М – маркер розміру фрагментів ДНК.*

Зважаючи на те, що у всіх спостереженнях, за результатами генотипування, були одержані ДНК-профілі, де мала місце явна експансія фрагментів розміром від 520 до 620 п.н., останні можна вважати за маркер наявності в пацієнта пухлини.

Серед 18 хворих, у яких діагностовано ранній рак шлунка з відсутністю метастазів у лімфатичні вузли, дисеміновані пухлинні клітини були виявлені у п'яти випадках, з яких при низькодиференційованій аденокарциномі та низькодиференційованій

аденокарциномі з переходом в перстневидноклітинний рак – по одному випадку відповідно, при недиференційованому раку – у двох і при перстневидноклітинному – у одному. Але в усіх випадках, в котрих були виявлені метастази у лімфатичні вузли, дисеміновані пухлинні клітини периферичної крові (за методом ISSR-PCR) також були виявлені.

У периферичній крові хворих на виразково-інфільтративний рак шлунка, у яких традиційними методами діагностують  $M_0$ , за допомогою молекулярно-біологічного методу ISSR-PCR пухлинні клітини виявлені у 27,8% випадків.

**Висновки та перспективи подальших розробок.** При виразково-інфільтративному раку шлунка генотипування слизової оболонки виявило стабільні ДНК-профілі, представлені експансією фрагментів розміром 520 та 620 п.н. (пар нуклеотидів). Це свідчить про їх генетичну однотипність і можливість використовувати як маркер малігнізації.

ДНК-типсування зразків пухлини пацієнтів, хворих на виразково-інфільтративний рак шлунка, що не мали візуальних метастазів, а також взятих від них зразків периферичної крові виявило досить стабільні ДНК-профілі у матеріалі пухлини, які були представлені експансією фрагментів розміром 520 та 620 п.н., але ампліфікаційні профілі периферичної крові цих пацієнтів дали позитивний результат лише у 27,8% випадків. Це вказує на здатність первинної пухлини до десимінації та ризик раннього метастазування.

У подальшому маркер планується дослідити на практиці з метою діагностики неопластичних змін епітелію слизової оболонки шлунка у хворих на хронічний атрофічний гастрит.

#### Список використаної літератури:

1. Абрамов Д. Д. Точность метода полимеразной цепной реакции «в реальном времени» / Д. Д. Абрамов, Д. Ю. Трофимов, Д. В. Ребриков // Прикл. биохимия и микробиология. – 2006. – Т. 42. – С. 485–488.
2. Аруин Л. И. Новая Международная классификация дисплазий слизистой оболочки желудка / Л. И. Аруин // Росс. журн. гастроэнтерологии, гепатологии, колонопроктологии. – 2002. – № 3. – С. 15–17.
3. Канцерогенез / под ред Д. Г. Заридзе. – Москва : Медицина, 2004. – 576 с.
4. Карселадзе А. И. Некоторые основополагающие понятия онкоморфологии в свете достижений современной молекулярной биологии / А. И. Карселадзе // Архив пат. – 2009. – Вып. 5. – С. 17–21.
5. Шалімов С. О. Рак в Україні, 2000–2001 / С. О. Шалімов, З. П. Федоренко, Л. О. Гулак // Бюлетень національного канцер-реєстру України. – Київ, 2002. – 73 с.
6. Янкин А. В. Скрининг рака желудка / А. В. Янкин // Практ. онкология. – 2010. – № 11(2). – С. 96–101.
7. Baldi P. Sequence analysis by additive scales: DNA structure for sequences and repeats lengths / P. Baldi, P. F. Baisnee // Bioinformatics. – 2000. – Vol. 16. – P. 865–889.
8. Freimer N. B. Microsatellites: evolution and mutational process / N. B. Freimer, M. Slatkin // Ciba Found Symp. – 1996. – №197. – P. 51–67.

9. Tsanev R. Molecular mechanisms of cancer cells survival / R. Tsanev // J. BUON. – 2005. – № 10. – P. 309–318.
10. Wooster R. Instability of short tandem repeats (microsatellites) in human cancers / R. Wooster, A. M. Cleton-Jansen, N. Collins // Nat. Genet. – 1999. – № 6. – P. 152–156.

Рекомендує до друку С.М. Білаш  
Отримано 14.09.2016 р.

### **А.В. Харченко**

Полтавський національний педагогічний університет імені В.Г. Короленко

## **ИЗМЕНЕНИЯ СЛИЗИСТОЙ ОБОЛОЧКИ ЖЕЛУДКА, КОТОРЫЕ ВЫЯВЛЕНЫ ПРИ ПОМОЩИ МОЛЕКУЛЯРНО-БИОЛОГИЧЕСКОГО МЕТОДА У ПАЦИЕНТОВ, БОЛЬНЫХ РАКОМ ЖЕЛУДКА**

Среди многочисленных маркеров, базирующихся на использовании полимеразной цепной реакции (PCR), особенное место занимают те, которые являются фрагментами ДНК, расположенными между локусами инвертных повторов ДНК, и известные как ISSR (Inter simple sequence repeats). Использованию этих маркеров предшествует открытие того факта, что эукариотные геномы в среднем на 30-90% представлены высокополиморфными повторяющимися последовательностями. Повторяющаяся ДНК выполняет особую функцию в абсорбции мутаций. Насыщенность геномов микросателлитными последовательностями является результатом действия многих факторов, среди которых одним из основных является уровень стабильности микросателлитной ДНК.

Интенсивное добавление микросателлитных последовательностей за счет репликационных ошибок имеет название микросателлитной экспансии. Большинство микросателлитных мутаций связаны с инсерциями или делециями некоторых повторов, происходящих во время репликации. Такое нарушение стабильности микросателлитов чаще всего происходит по причине образования петель на ДНК во время репликации («slippage»). Характер и закономерности распределения в геноме микросателлитов имеет особый интерес благодаря той роли, которую они играют в развитии онкологических заболеваний.

Проведена диагностика при помощи реакции ISSR-PCR, которая показала изменения ДНК эпителия слизистой оболочки, характерные для дисплазии эпителия разной степени тяжести в слизистой оболочке желудка у пациентов, которые болеют язвенно-инфильтративным раком желудка. В случаях с указанными дисплазиями образовались изменения в виде увеличения размеров ампликонов, которые являются характерными признаками малигнизации. Описанные изменения имеют характер микросателлитных экспансий. Амплификационные профили периферической крови пациентов, которые не имели визуальных метастазов, дали позитивный результат в 27,8% случаев. Это указывает на способность первичной опухоли к диссеминации и риск раннего метастазирования.

*Ключевые слова:* ДНК, ампликоны, фенотип.

### **O.V. Kharchenko**

Poltava V.G. Korolenko National Pedagogical University

## **CHANGES OF GASTRIC MUCOSA DETECTED BY THE MOLECULAR- BIOLOGICAL METHOD IN PATIENTS WITH GASTRIC CANCER**

Among many markers based on the use of polymerase chain reaction (PCR), a special place is occupied by those that are DNA fragments located between loci of invert DNA repeats, and known as ISSR (Inter simple sequence repeats). The use of these markers is preceded by opening of the fact that

eukaryotic genomes are on average 30-90% represented by high polymorphic repeating sequences. Repeating DNA performs a special function in the absorption of mutations. The saturation of genomes by microsatellite sequences is the result of many factors, among which one of the main is the level of stability of microsatellite DNA.

The intensive addition of microsatellite sequences due to replication errors is called microsatellite expansion. Most microsatellite mutations are associated with insertions or deletions of some repeats occurring during replication. Such a violation of the stability of microsatellites most often occurs due to the formation of loops in the DNA during replication («slippage»). The nature and patterns of distribution of microsatellites in the genome has a special interest because of the role they play in the development of cancer.

Diagnostics of mucosa, provided by the ISSR-PCR reaction, showed the DNA changes of gastric mucosa epithelium, typical for epithelial dysplasia of varying severity in gastric mucosa of patients, suffering from ulcerative-infiltrating gastric cancer. In cases of specified dysplasia, changes in form of enlargement of amplicones have been generated, which are typical for malignancy manifestations. The described changes are of microsatellite expansion origin. Amplification profiles of peripheral blood samples of patients without visual metastases were positive in 27,8% of cases. This indicates the ability of primary tumor to dissemination and risk of early metastasing.

**Key words:** *DNA, amplicones, phenotype.*