

5. Лазюк Г.И. Облучение населения Беларуси вследствие аварии на Чернобыльской АЭС и динамика врожденных пороков развития. // Междунар. журн. радиац. медицины. – 1999. – № 1. – С. 63-70.
6. Барияк І.Р., Неумержицька Л.В., Свтушок Л.Є., Шкарупа В.М. Оцінка вроджених вад розвитку в північно-західному регіоні України // Фактори експериментальної еволюції організмів. Зб. наук. праць. – Київ. – 2008. – Т.4 – С. 358-362.
7. Волкова Г.С. Світовий дослід ведення реєстрів уроджених вад розвитку // Вісн. стоматології. – 1999. – № 2. – С. 59-61.
8. EUROCAT Report 7 / Scientific Institute of Public Health – Louis Pasteur – Brussels, 1997. – 181 p.
9. Кирилова Е.А., Никифорова О.К., Жученко Н.А. Мониторинг врожденных пороков развития у новорожденных // Рос. вестн. перинатологии и педиатрии – 2000. – № 1. – С.18-21.
10. Минков И.П. Мониторинг врожденных пороков развития, их пренатальная диагностика, роль в патологии у детей и пути профилактики // Перинатология та педіатрія. – 2000. – №1. – С. 8-13.
11. Населення України, 2000 р. Статистичний щорічник. – К.: Держкомстат України, 2004. – 208 с.

Резюме

Частота вроджених вад розвитку в Черкаській області за період 1997-2007 рр. аналогічна середньому значенню цього показника по Україні (27,3 та 26,0 на 1000 н/н відповідно). Спостерігається динаміка зменшення частоти вроджених вад розвитку в області за досліджуваний період. Виявлені значні регіональні відмінності частоти вроджених вад розвитку в області (13,2 - 55,8 на 1000 н/н). Середній показник цієї патології в радіаційно-забруднених районах (33,2:1000 н/н) більший ніж в умовно «чистих» (21,9:1000 н/н). Найбільша частота вроджених вад розвитку виявлена в районах з підвищеним рівнем хімічного забруднення.

Частота врожденных пороков развития в Черкаской области за период 1997-2007 гг. аналогична среднему значению этого показателя по Украине (27,3 и 26,0 на 1000 н/р соответственно). Наблюдается динамика уменьшения частоты врожденных пороков развития в области за исследуемый период. Выявлены значительные региональные отличия частоты врожденных пороков развития в области (13,2 - 55,8 на 1000 н/р). Средний показатель этой патологии в радиационно загрязненных районах больше, чем в условно «чистых» (21,9:1000 н/р). Наибольшая частота врожденных пороков развития выявлена в районах с повышенным уровнем химического загрязнения.

Frequency of congenital developmental anomalies in the Cherkassy region for the period 1997-2007 is similar to average value of this parameter across Ukraine (27,3 and 26,0 on 1000 n/b accordingly). Dynamics of reduction of frequency of congenital developmental anomalies in the field of for the investigated period is observed. Significant regional differences of frequency of congenital developmental anomalies in the field of (13,2 - 55,8 on 1000 n/b) are revealed. The average indice of this pathology in radiation polluted areas is more, than in conditionally "pure" (21,9:1000 n/b). The greatest frequency of congenital developmental anomalies is revealed in areas with the raised level of chemical pollution.

ШВАЧКО Л.П., ТЕЛЕГЕЕВ Г.Д.

Институт молекулярной биологии и генетики НАН Украины

Украина 03143, Киев, ул. Заболотного, 150. l.p.shvachko@imbg.org.ua

АЛЬТЕРНАТИВНАЯ ЭКСПРЕССИЯ ДНК – МЕТИЛТРАНСФЕРАЗНЫХ ГЕНОВ В ДИНАМИКЕ МИЕЛОПРОЛИФЕРАТИВНОГО ЗАБОЛЕВАНИЯ

В неопластических клетках существенным образом изменяется паттерн ДНК-метилирования, по сравнению с нормальными соматическими клетками [1]. При этом, глобальное геномное гипометилирование парадоксально сопровождается увеличением ДНК-метилтрансферазной активности и локальным гиперметилированием CpG-островков, как правило, в 5'-промоторных участках генов [2]. Доказано, что aberrантное метилирование de novo CpG-островков, в норме не метилированных, является особенностью иммортализованных и трансформированных клеток, и связано в большинстве случаев с инактивацией генов - супрессоров опухолевого роста [3]. Считается, что aberrантное метилирование CpG-островков является ранним событием в процессе возникновения опухоли [4]. Таким образом, становится очевидным исследование характера экспрессии альтернативных генетических вариантов ДНК-метилтрансферазной активности, парадоксально ассоциирующейся с геномным гипометилированием в неопластических клетках [5]. Также, вопрос о происхождении самой ДНК- метилирующей активности, коррелирующей с промоторным CpG-метилированием, в литературе неоднозначен [6]. Поэтому, изменение экспрессии разных вариантов ДНК-метилтрансферазных генов может подчеркивать их дифференцированную роль в механизме опухолевой прогрессии и в эпигенетике рака, в частности.

Методом RT-PCR нами исследована альтернативная экспрессия ДНК метилтрансферазных генов DNMT1, DNMT3A и DNMT3B, кодирующих функционально различные ДНК метилтрансферазы, в генезисе миелопролиферативного заболевания истинная полицитемия - хронический миелолейкоз (СМЛ).

Материалы и методы.

Лимфоциты из 10 мл цельной крови пациента выделяли в градиенте фиколюверографина ($\rho = 1,078$), собирали центрифугированием и промывали 2 раза в PBS буфере. Клеточность фракции лимфоцитов подсчитывали с помощью камеры Горяева. Для выделения РНК клеточность лимфоцитов не превышала 5×10^6 в 1 мл. Тотальную РНК из лимфоцитов крови выделяли используя гуанидинтиоцианат как описано [7]. Контроль препаратов РНК проводили электрофорезом в 1,8 % агарозном геле в $1 \times$ Трис-ацетатном буфере, рН 7,6. Синтез кДНК проводили с помощью обратной транскриптазы (40 ед. фермента, 37° С, 60 мин.). В RT-PCR использовались синтезированные праймеры для 3-х альтернативных вариантов - DNMT1, DNMT3A, DNMT3B генов. Оптимизированными условиями RT-PCR амплификации был горячий отжиг праймеров (Perkin-Elmer Applied Biosystems).

Результаты и их обсуждение.

У млекопитающих, в том числе у человека, известны три фермента, осуществляющие метилирование геномной ДНК: паттерн ДНК-метилтрансфераза DNMT1 и две de novo ДНК-метилтрансферазы DNMT 3A и 3B (Рисунок 1) [8].

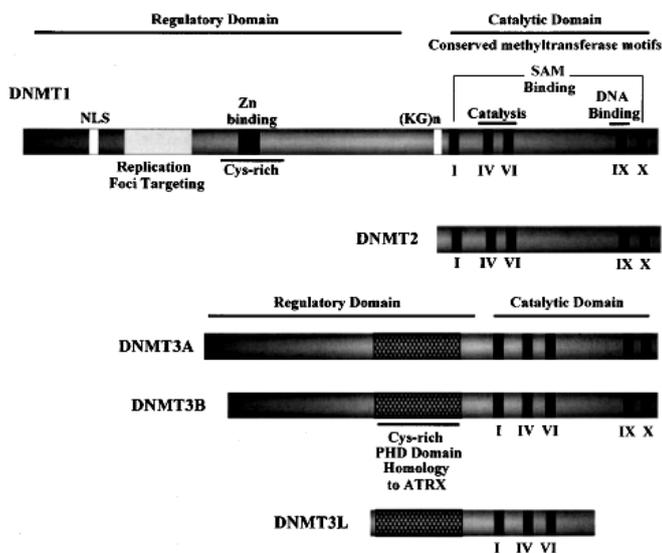


Рисунок 1. Структура известных ДНК метилтрансфераз DNMT1, DNMT3A, DNMT3B (K.D. Robertson, DNA methylation, methyltransferases, and cancer. - Oncogene – 2001, - 20. -P. 3139–3155)

DNMT1 – основной фермент пострепликативного метилирования геномной ДНК [8, 9]. Активность фермента резко возрастает с началом синтеза ДНК и в первые минуты после репликации профиль метилирования дочерней нити воссоздается по образцу материнской (геми-метилирование ДНК) [9].

ДНК-метилтрансферазы DNMT 3A и DNMT 3B необходимы для метилирования ДНК de novo и экспрессируются только на ранних эмбриональных стадиях развития [9]. Тем не менее, экспрессия de novo вариантов DNMT 3A и DNMT 3B в соматических клетках взрослого организма очень низка [10]. Роль данных генов в канцерогенезе связывают с de novo метилированием в неметилированных CpG-островках [10, 11].

Нами исследован характер экспрессии трех ДНК-метилтрансферазных генов DNMT1, DNMT3A, DNMT3B с помощью обратнo-транскриптазной полимеразной цепной реакции (RT-PCR) на фоне миелопролиферативного процесса у 4-х пациентов: трех с клиническим диагнозом хронический миелолейкоз (СМЛ) и одного с истинной полицитемией.

Истинная полицитемия – хроническое заболевание системы крови, характеризующееся эритропенией, которое может рассматриваться промаллигнизирующей стадией миелопролиферативного синдрома. Хронический миелолейкоз – онкологическое заболевание лимфатической ткани, при котором опухолевые лимфоциты накапливаются в периферической крови, костном мозге и лимфатических узлах. В отличие от острых лейкозов, процесс идет достаточно медленно, вследствие чего нарушения кроветворения развиваются лишь на поздних стадиях болезни.

Как показано на рисунке 2, при истинной полицитемии имеет место доминирующая экспрессия паттерн DNMT1 метилтрансферазы, которая сочеталась с экспрессией de novo ДНК метилтрансферазы DNMT3A. В то же время, вариант de novo метилирования DNMT3B не экспрессировался у пациента с истинной полицитемией. У троих пациентов с хроническим миелолейкозом (СМЛ) паттерн экспрессии мРНК исследуемых ДНК-метилтрансферазных генов существенным образом меняется. По

результату RT-PCR у пациентов с CML выявлено резкое снижение уровня экспрессии паттерн ДНК-метилтрансферазы DNMT1, отсутствие de novo варианта DNMT3A и доминирующая суперэкспрессия de novo DNMT3B ДНК-метилтрансферазного гена. Как показано, уровень экспрессии de novo DNMT3B варианта может коррелировать с клинической отягощенностью течения хронического лейкоза у индивидуальных пациентов (рисунок2).

Таким образом, данное исследование может свидетельствовать о диагностически значимом подходе в изучении контроля экспрессии ДНК-метилтрансферазных генов DNMT1, DNMT3A и DNMT3B, кодирующих функционально различные ДНК метилтрансферазы, в патогенезе миелопролиферативного заболевания, в частности, патологической роли de novo DNMT3B варианта ДНК-метилования в динамике онкологической прогрессии.

DNMT1/ DNMT3A/ DNMT3B

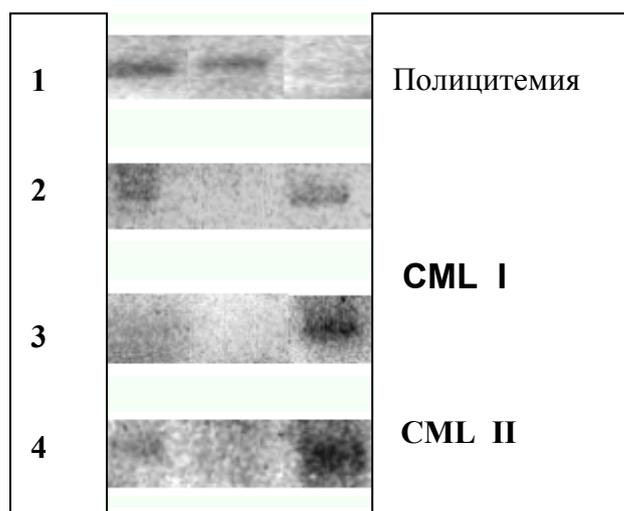


Рисунок 2. Дифференцированная экспрессия ДНК метилтрансферазных генов в динамике миелопролиферативного заболевания у разных пациентов.

Выводы. Методом RT-PCR показано, что в генезисе миелопролиферативного заболевания истинная полицитемия – хронический миелолейкоз имеет место существенное изменение паттерна экспрессии ДНК-метилтрансферазных генов и вклад de novo метилирования в клинику онкологической прогрессии. Суперэкспрессия мРНК de novo варианта DNMT3B сопровождает прогрессию миелопролиферативного заболевания, при резком снижении уровня экспрессии DNMT1, ключевого фермента метилирования соматического генома.

Показана прогностическая оценка статуса экспрессии DNMT3B у исследованных пациентов.

Литература.

1. Baylin S. B., Herman J. G., Graff J. R., Vertino P. M., Issa J. P. Alterations in DNA methylation: a fundamental aspect of neoplasia. - *Adv. Cancer Res.* -1998.- **72**, - P. 141-196.
2. Szif M. Targeting DNA methylation in cancer. – *Bull. Cancer* – 2006. – **93**. – P. 5358-5360.
3. Esteller M., Corn P. G., Baylin S. B., Herman J. G. A gene hypermethylation profile of human cancer. - *Cancer Res.* -2001. – **61**. – P. 3225-3229.
4. Herman J.G., Baylin S.B. Promoter-region hypermethylation and gene silencing in human cancer. –*Cur. Top. Microbiol. Immunol.* – 2000. -**16**. –P. 168-174.

5. Eads C. A., Danenberg K. D., Kawakami K., Saltz L. B., Danenberg P. V., Laird P. W. CpG island hypermethylation in human colorectal tumors is not associated with DNA methyltransferase overexpression. - *Cancer Res.* – 1999. – V.59. – P. 2302-2306.
6. Rhee I., Bachman K. E., Park B. H., Jair K. W., Yen R. W., Schuebel K. E., Cui H., Feinberg A. P., Lengauer C., Kinzler K. W., Baylin S. B., Vogelstein B. DNMT1 and DNMT3b cooperate to silence genes in human cancer cells.- *Nature (Lond.)* -2002. – **416**. –P. 552-556.
7. Chomczynski P., Sacchi N. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. - *Anal. Biochem.* – 1987.-**162**.–P.156-159.
8. Robertson K.D., DNA methylation, methyltransferases, and cancer. – *Oncogene* – 2001. – **20**. – P. 3139–3155.
9. Li E., Bestor T.H., Jaenisch R. Targeted mutation of the DNA methyltransferase gene results in embryonic lethality. – *Cell* – 1992. –**62**. - P.915-926.
10. Robertson K. D., Uzvolgyi E., Liang G., Talmadge C., Sumegi J., Gonzales F. A., Jones P. A. The human DNA methyltransferases (DNMTs) 1, 3a and 3b: coordinate mRNA expression in normal tissues and overexpression in tumors. -*Nucleic Acids Res.* – 1999. – **27**. – P. 2291-2298.
11. Mizuno S., Chijiwa T., Okamura T., Akashi K., Fukumaki Y., Niho Y., Sasaki H. Expression of DNA methyltransferases DNMT1, 3A, and 3B in normal hematopoiesis and in acute and chronic myelogenous leukemia.- *Blood* – 2001. – **97**. – P. 1172-1179.

Резюме

Внимание уделено изучению альтернативной экспрессии ДНК- метилтрансферазных генов, методом RT-PCR, в динамике миелопролиферативного заболевания на примере истинной полицитемии и хронического миелолейкоза. Показано, что в генезисе миелопролиферативного заболевания имеет место существенное изменение паттерна экспрессии ДНК- метилтрансферазных генов и вклад de novo метилирования в клинику онкологической прогрессии. Суперэкспрессия мРНК de novo варианта DNMT3B сопровождает прогрессию миелопролиферативного заболевания при резком снижении уровня экспрессии DNMT1, ключевого фермента метилирования соматического генома. Показана прогностическая оценка статуса экспрессии DNMT3B у исследованных пациентов.

Увага зосереджена на альтернативній експресії ДНК-метилтрансферазних генів в динаміці міелопроліферативного захворювання на прикладі істинної поліцитемії та хронічного міелолейкозу. Показано, що в генезисі міелопроліферативного захворювання має місце суттєва зміна паттерну експресії мРНК ДНК-метилтрансферазних генів та вклад аномального de novo метилювання ДНК в клініци онкологічної прогресії. Показана прогностична оцінка статусу експресії DNMT3B у досліджених пацієнтів.

The same stage-specific alterations of DNA Methyltransferase Expression have been presented. There was analyzed expression of DNA methyltransferase (DNMTs) genes by RT-PCR and shown the different DNA methyltransferase patterns expression during four pathogenetic myeloproliferative stages. We found that DNMT1, 3A, and 3B mRNA levels have diversity positive correlation with polycythemia and CML as the stage-specific myeloproliferation syndromes. DNMT1, and 3A showed the highest expression for polycythemia patient and thought to did not correlate with CML cancer progression. In contrast, de novo DNMT3B showed the highest expression for three CML patients with insignificant DNMT1, and without DNMT3A expression. In summary we have resumed that de novo DNMT3B overexpression mRNA commonly correlated with stage-specific myeloproliferation pathogenesis in CML patients. Have been shown the prognosis value of DNMT3B Expression Status for the patients were investigated.