

Висновки

У роботі досліджено розподіл генотипів у дітей, які постійно перебувають у контакті з генотоксичними чинниками (проживають в умовах радіаційно і хімічно забрудненого довкілля). У дітей, в яких встановлений різний ступінь важкості протікання екологічно детермінованої патології виявлено зростання частоти гомозиготного носійства делетованих алелів гена GSTT1.

Література

1. *Nei M.* Analysis of gene diversity in subdivided populations // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1973. V. 70.
2. *Lewontin R.C.* The genetic basis of evolutionary chance. N.Y.; London: Columbia Univ. Press, 1974. 351.
3. *Kelada S.N., Eaton D.L., Wang S.S. et al.* The role of genetic polymorphisms in environmental health // Environmental Health Perspectives. V. 111. № 81. P. 1055-1064. 645.
4. *Баранов В.С., Баранова Е.В., Иващенко Т.Э., Асеев М.В.* Геном человека и гены предрасположенности (Введение в предиктивную медицину). Санкт-Петербург: «Интермедика», 2000. 272с.
5. *Спицын В.А., Цыбикова Э.Б., Агапова Р.К. и др.* Влияние наследственных факторов на переносимость хирургических операций у больных раком легкого // Генетика 1996. Т. 32. № 5. С. 691-701.
6. *Mace, K., Bowman, E. D., Vautravers, P., Shields, P. G., Harris, C. C., and Pfeifer, A. M.* Characterization of xenobiotic-metabolizing enzyme expression in human bronchial mucosa and peripheral lung tissues. Eur. J. Cancer, 34: 914–920, 1998.
7. *Rollinson S, Roddam P, Kane E, et al.* Polymorphic variation within the glutathione S-transferase genes and risk of adult acute leukaemia. Carcinogenesis. 2000;21:43-47
8. *Rebbeck T.R.* Molecular epidemiology of the human glutathione S-transferase genotypes GSTM1 and GSTT1 in cancer susceptibility. Cancer Epidemiol Biomarkers Prev 6: 733-743, 1997.
9. *Трахтенберг И.М.* Приоритетные аспекты фундаментальных исследований в токсикологии // Тез. докл. 1 съезда токсикологов Украины. – К., 2001. – С. 5-6.
10. *Довкілля Івано-Франківщини: Статистичний збірник / За ред. Л.О.Зброй.* – 2004. – 133 с.
11. *Arand M., Muhlbauer R., Hengstler J. et al.* Multiplex Polymerase chain Reaction for the Glutathione S-Transferase GSTM1 and GSTT1 polymorphisms // Analytical Biochemistry. – 1996. – № 236. –Р. 184-186.

Резюме

Вивчено алельний поліморфізм генів GSTM1, GSTT1 II фази біотрансформації ксенобіотиків серед дітей, що проживають на територіях, забруднених генотоксичними чинниками. Дослідження показало, що маркером схильності до розвитку і важкості перебігу соматичних захворювань можна вважати генотип GSTT1 « – ».

Изучен алельный полиморфизм генов GSTM1, GSTT1 II фазы биотрансформации ксенобiotиков среди детей, проживающих в условиях загрязненной окружающей среды. Проведенное исследование показало, что маркером предрасположенности к развитию и тяжести течения заболеваний можно считать генотип GSTT1 « – ».

Authors studied genes polymorphism of GSTM1, GSTT1, which participate in II phase of xenobiotics transformation, in children which live on polluted territories. The study showed that genotype GSTT1 « – » could be estimated as marker of predisposition to development and more severe course of ecologically caused disease.

**ВОРОБЬЕВА Л. И., ВДОВИЧЕНКО Н.И., МИКУЛИНСКИЙ Ю. Е.,
КУЛЬШИН В.Е.**

ИЗУЧЕНИЕ СТАТУСА МЕТИЛИРОВАНИЯ ГЕНОВ GSTP1, RASSF1A, APC ДЛЯ ДИАГНОСТИКИ РАКА ПРЕДСТАТЕЛЬНОЙ ЖЕЛЕЗЫ

Рак предстательной железы (РПЖ) занимает одно из ведущих мест среди злокачественных новообразований у мужчин. Обычно смерть от данного заболевания является следствием поздней его диагностики. В этой связи существует настоятельная необходимость в разработке методов диагностики ранних стадий опухоли. Разработанные до настоящего времени диагностические тесты на рак предстательной железы не обладают достаточно высокой чувствительностью и специфичностью. В качестве основного диагностического теста в настоящее время используется количественное определение в сыворотке крови простатического специфического антигена (ПСА). Однако ПСА не является строго специфичным маркером для рака простаты, повышение его уровня также может наблюдаться при доброкачественной гиперплазии и простатите [1,2].

В последнее десятилетие было установлено, что в многостадийном процессе образования опухолей нарушение функций клеточных генов может происходить не только в результате генетических событий, но и в результате эпигенетических изменений, в том числе локального гиперметилирования ДНК. Метилирование вовлечено в такие фундаментальные процессы жизнедеятельности клетки, как регуляция экспрессии генов и поддержание стабильности генома.

Аберрантному метилированию в опухолевых клетках подвергаются специфические последовательности – CpG-островки, ассоциированные с 5' регуляторными районами многих генов. В нормальных клетках большинство CpG-островков не метилировано, а их метилирование в опухолевых клетках, как правило, сопровождается подавлением транскрипции соответствующего гена, наследуемой при делении клетки. В последнее время разработаны методы идентификации гиперметилированных районов ДНК, основанные на дифференциальном статусе метилирования CpG-островков в нормальных и опухолевых клетках [3,4].

Цель данной работы состояла в исследовании статуса метилирования промоторов генов, ассоциированных с развитием РПЖ, экспрессия которых может быть подавлена вследствие нарушения метилирования ДНК.

Материалы и методы

Объектом исследования служила сыворотка крови мужчин в возрасте 56-78 лет. Количество обследуемых составило 89 человек. Для определения концентрации общего ПСА сыворотки крови, а также свободного ПСА (свПСА) использовались иммуноферментные тест-системы. Статус метилирования промоторов генов определяли с помощью метода метил-специфической ПЦР (МС-ПЦР). Принцип данного метода состоит в том, что в ходе обработки выделенной из сыворотки крови пациента ДНК бисульфитом натрия, неметилированный цитозин превращается в урацил, а метилированный цитозин не модифицируется. Затем ДНК амплифицируется с помощью ПЦР, используя две пары праймеров, одна из которых специфична к метилированной ДНК, другая – к неметилированной ДНК. После амплификации обработанной ДНК в продукте ПЦР происходит замена урацила на остаток тимина, в то время как метилированный остаток цитозина остается остатком цитозина [5].

Полученные результаты оценивались по критерию Фишера.

Результаты и обсуждение

Для исследования связи уровня метилированных последовательностей промоторов генов с развитием рака предстательной железы обследуемые мужчины были разделены на три клинические группы по уровню ПСА в сыворотке крови. В

первую группу (а) со значениями ПСА более 20 нг/мл были объединены больные раком предстательной железы; во вторую экспериментальную группу (b) с ПСА 10 - 20 нг/мл - больные с гиперплазией и возможным раком простаты; в третью группу (с) вошли клинически здоровые мужчины с ПСА до 2 нг/мл.

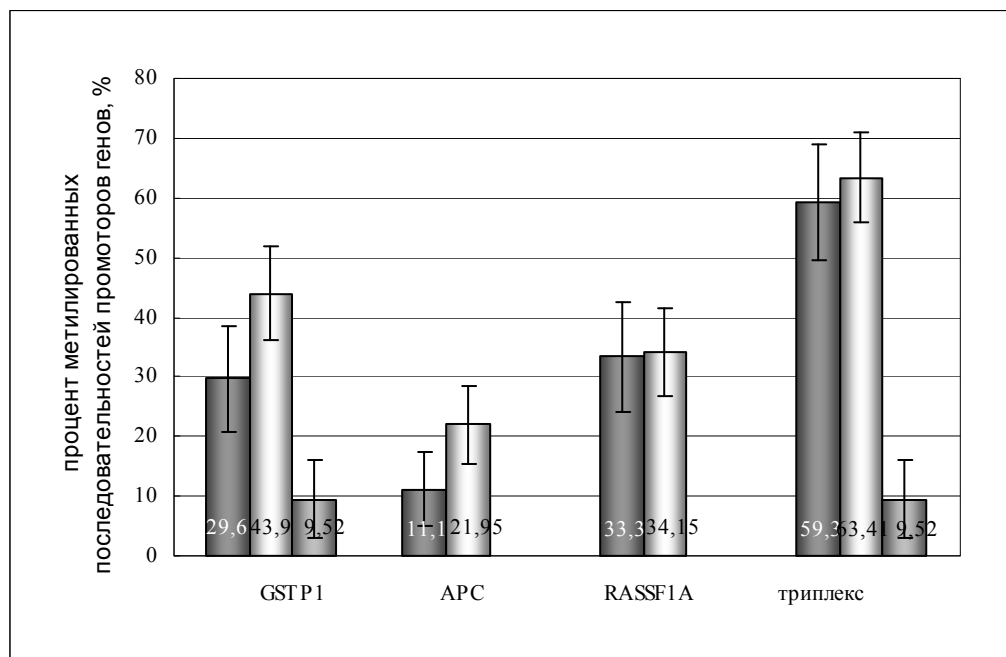


Рис.1 Сравнение уровня метилированных последовательностей промоторов генов в трех клинических группах: а – б – с –

Установлено (рис.1), что для всех трех генов наблюдается значительный процент метилирования промоторных областей в первых двух группах в отличие от группы здоровых мужчин. Суммарный процент по трем генам составил 59,3% в первой группе, 63,4% во второй группе и 9,5% в третьей группе. Полученные результаты в указанных группах достоверно отличаются от контрольных показателей третьей группы ($P < 0,01$), за исключением гена GSTP1, который проявил низкую специфичность, т.к. метилированные последовательности промотора этого гена обнаруживаются и в группе здоровых мужчин. Полученные данные не позволяют выделить больных с гиперплазией и больных раком простаты, т.к. различия между первой и второй группой не достоверны.

Мы также проанализировали уровень метилирования данных генов в подгруппах с различным отношением свободного ПСА к общему ПСА (рис.2); исследования проводили на сыворотке крови пациентов второй группы (b) с уровнем ПСА 10-20 нг/мл. На основании данного теста мы выделили три подгруппы: I) содержание свПСА до 10% (рак предстательной железы); II) 10-15% свПСА («серая зона»); III) 16-25% свПСА (доброкачественная гиперплазия простаты).

В подгруппе (I) уровень метилирования промотора гена GSTP1 значительно выше, чем в подгруппе (II) ($P < 0,05$), что может быть использовано для дифференциальной диагностики гиперплазии и рака в «серой зоне». Для двух других генов не было обнаружено достоверных отличий в подгруппах (I) и (II). Суммарный процент метилирования промоторов трех генов для данной подгруппы максимальный и составляет 82,4%.

В подгруппе (III) наблюдается низкий процент метилирования промоторных областей всех трех генов. Сравнивая результаты подгрупп (I) и (II) с подгруппой (III) достоверную разницу можно утверждать только для гена RASSF1A ($P < 0,01$), что может использоваться для дифференциальной диагностики простаты.

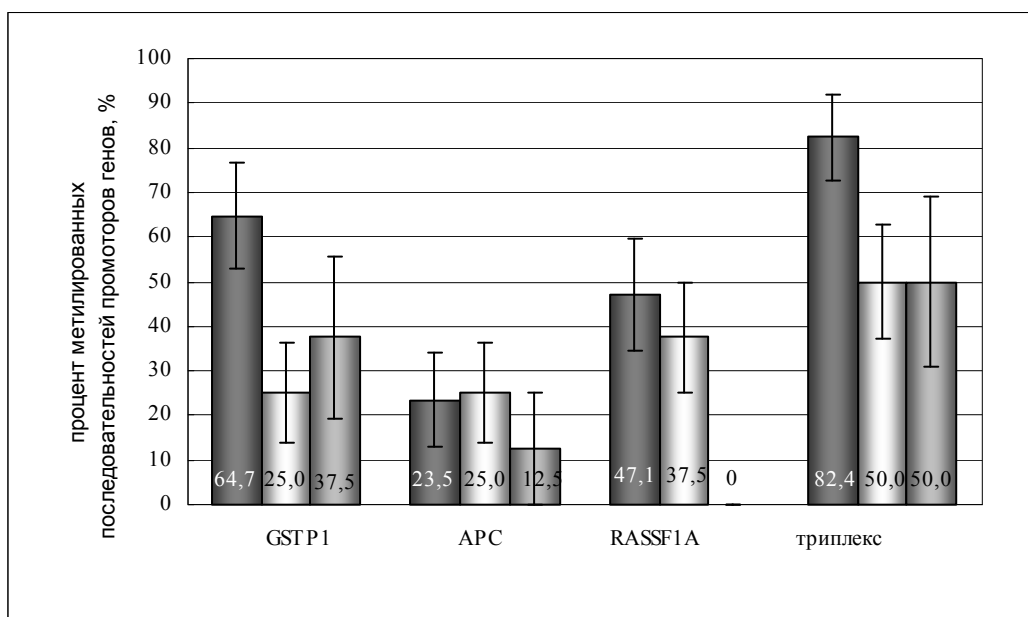


Рис.2 Уровень метилированных последовательностей промоторов генов у мужчин с гиперплазией и возможным раком предстательной железы (ПСА 10 - 20 нг/мл): I – ■; II – □; III – ▒

В работе [6] обследовали образцы тканей у 53 пациентов с первичным РПЖ и образцы неопухолевых тканей простаты. Было показано, что гиперметилирование CpG островков генов GSTP1, APC и PTGS2 значительно выше в образцах РПЖ (71-91%) и может служить отличительным признаком между РПЖ и неопухолевой тканью простаты (например, гиперплазией простаты). Уровень метилирования двух генов (GSTP1, APC) коррелировал со стадией опухоли, уровнем дифференцировки по Глиссону и распространением опухоли за пределы простаты, но не с уровнем ПСА, что согласуется с полученными нами результатами.

Анализ уровня метилирования гена RASSF1A в [6] показал положительный результат в 28% случаев при доброкачественной гиперплазии, которая может представлять собой неагрессивную раннюю форму рака. В нашем исследовании в группе пациентов с гиперплазией и возможным РПЖ уровень метилирования RASSF1A оказался выше (34,2%).

В работе [7] исследовали ткань простаты 55 мужчин после простатэктомии и 35 мужчин с негативной биопсией простаты. Гиперметилирование CpG островков промоторной области гена GSTP1 определяли используя метил-чувствительные рестриктазы. У мужчин с негативной биопсией простаты не было обнаружено гиперметилирования указанной области в свободной ДНК сыворотки крови. В группе мужчин с локализованным РПЖ и у больных с метастазами было обнаружено гиперметилирование в 12% и 28% случаев соответственно ($P = 0,003$). Был сделан вывод, что гиперметилирование островков промотора гена GSTP1 может служить сывороточным биомаркером для обнаружения РПЖ и метастазов. В нашем исследовании метилированные последовательности промотора гена GSTP1 обнаруживаются и в группе здоровых мужчин, что возможно связано с использованием различных методов для определения метилирования.

Выводы

Полученные нами данные показывают возможность применения метода МС-ПЦР при диагностике РПЖ. Мы предполагаем, что при расширении панели генов-кандидатов для анализа метилирования можно значительно увеличить диагностическую чувствительность и специфичность метода. Внедрение нового метода в клиническую практику обеспечит возможность отбора людей, подвергающихся

повышенному риску развития РПЖ, а наблюдение за их состоянием позволит обнаруживать опухоли на ранних стадиях развития и проводить своевременную и, соответственно, более эффективную терапию.

Литература

1. *Воробьев А.В.* Скрининг мужского населения, стандартное обследование пациентов, классификация рака предстательной железы // Практическая онкология. – 2001. – №2. – С.8-16
2. Алгоритм ранней диагностики рака предстательной железы // Урология и нефрология. – 2003. – №9. – С.3-16
3. *Walsh C.P., Xu G.L.* Cytosine methylation and DNA repair // *Curr. Top Microbiol. Immunol.* – 2006. – Vol.301. – P. 283-315
4. *Mann J.R., Szabo P.E., Reed M.R., Singer-Sam J.* Methylated DNA sequences in genomic imprinting // *Crit Rev Eukaryot Gene Expr.* – 2000. – Vol.10(3-4). – P.241-257
5. *Hajkova P., El-Maarri O., Engemann S. et al.* DNA-Methylation Analysis by the Bisulfite-Assisted Genomic Sequencing Method // *Methods in Molecular Biology.* – 1998. – Vol.200. – P.143-154
6. *Bastian P.J., Ellinger J., Wellmann A.* Diagnostic and Prognostic Information in Prostate Cancer with the Help of a Small Set of Hypermethylated Gene Loci // *Clinical Cancer Research.* – Vol. 11. – P.4097-4106
7. *Bastian P.J., Palapattu G.S., Lin X., Yegnasubramanian S.* Preoperative serum DNA GSTP1 CpG island hypermethylation and the risk of early prostate-specific antigen recurrence following radical prostatectomy // *Clin Cancer Res.* – 2005. – Vol.11(11). – P.4037-4043
8. *Liu L., Yoon J.H., Dammann R., Pfeifer G.P.* Frequent hypermethylation of the RASSF1A gene in prostate cancer // *Oncogene.* – 2002. – Vol.21(44). – P.6835-6840

Резюме

Исследовали статус метилирования промоторов генов, изменения в экспрессии которых ассоциированы с развитием рака предстательной железы. Полученные данные показывают возможность применения метода метил-специфической ПЦР при диагностике рака простаты.

Вивчали статус метилування промоторів генів, зміни в експресії яких пов'язані з розвитком раку передміхурової залози. Отримані дані показують можливість використання метода метил-специфічної ПЛР при діагностиці раку простати.

We have investigated methylation status of the promoters of genes which expression is associated with prostate cancer development. Our data suggest the potential significance of the method methylation-specific PCR in the prostate cancer diagnostics.

ГЕНИК-БЕРЕЗОВСЬКА С.О.

*Институт спадкової патології АМН України
Україна, 79000, Львів, МСП-169, вул.Лисенка 31а,
e-mail: root@ihp.lviv.ua*

АНАЛІЗ ЕФЕКТИВНОСТІ ВИКОРИСТАННЯ РЕГІОНАЛЬНОГО РЕЄСТРУ ПРИРОДЖЕНИХ ВАД РОЗВИТКУ СЕРЕД НОВОНАРОДЖЕНИХ У ПОЛОГОВИХ ЗАКЛАДАХ ЛЬВІВСЬКОЇ ОБЛАСТІ ДЛЯ УДОСКОНАЛЕННЯ МЕДИКО-ГЕНЕТИЧНОГО КОНСУЛЬТУВАННЯ НАСЕЛЕННЯ

Проблема вродженої та спадкової патології, в першу чергу природжених вад розвитку (ПВР) та аномалій, хромосомних та поширених моногенних захворювань, продовжує залишатися в ряді найбільш актуальних, незважаючи на значні успіхи у