

М.:Луч. - 2007.- 416 с.

2. Balanovsky O, Pocheshkhova E, Pshenichnov A, Solovieva D, Kuznetsova M, Voronko O, Churnosov M, Tegako O, Atramentova L, Lavryashina M, Evseeva I, Borinska S, Boldyreva M, Dubova N, Balanovska E. Is spatial distribution of the HIV-1-resistant CCR5Delta32 allele formed by ecological factors? //Journal of Physiological Anthropology and Applied Human Sciences. 2005 Jul;24(4):375-382.
3. Galvani, Novembre. The evolutionary history of the CCR5-Delta32 HIV-resistance mutation // Microbes Infect. 2005.- N 7(2).- P. 302-309.
4. Libert F, Cochaux P, Beckman G, Samson M, Aksenova M, Cao A, Czeizel A, Claustres M, Rua C, Ferrari M, Ferrec C, Glover G, Grinde B, Guran S, Kucinkas V, Lavinha J, Mercier B, Ogur G, Peltonen L, Rosatelli C, Schwartz M, Spitsyn V, Timar L, Beckman L, Parmentier M, Vassart G. The D ccr5 mutation conferring protection against HIV-1 in Caucasian populations has a single and recent origin in Northeastern Europe // Hum Mol Genet. 1998. 7: P.399–406.
5. Nei M. Molecular population genetics and evolution / Amsterdam: North-Holland Publ.C. 1975. 290 p.
6. Stephens JC, Reich DE, Goldstein DB, Shin HD, Smith MW, Carrington M, Winkler C, Huttley G, Allikmets R, Schriml L, Gerrard B, Malasky M, Ramos MD, Morlot S, Tzetzis M, Oddoux C, Giovine FS, Nasioulas G, Chandler D, Aseev M, Hanson M, Kalaydjieva L, Glavac D, Gasparini P, Kanavakis E, Claustres M, Kambouris M, Ostrer H, Duff G, Baranov V, Sibul H, Metspalu A, Goldman D, Martin N, Duffy D, Schmidtke J, Estivill X, O'Brien SJ, Dean M. Dating the origin of the CCR5-D32 AIDS-resistance allele by the coalescence of haplotypes // Am J Hum Genet. 1998. 62: P.1507–1515.
7. Zimmerman P.A., Wieseman M., Spalding T., Boatman B.A., Nutman T.B. A new intercellular adhesion molecule-1 allele identified in West Africans is prevalent in African-Americans in contrast to other North American racial groups // Tissue Antigens. - 1997. -N 50(6). - P.654-656.

Резюме

Проведено сравнительное исследование частоты делеционного аллеля del32 аутосомного СПИД-протекторного гена CCR5 в пяти украинских популяциях. Показано сходство украинцев и других славянских популяций по частоте этой делеции. Five Ukrainian populations have been genotyped for a deletion polymorphism del32 in CCR5 gene. It has been shown that frequency of this allele in Ukrainians is similar to that of the other Slavic populations.

СЄДНЄВА І.А.

*Державна установа “Інститут спадкової палогії” АМН України,
Україна, 79008, м. Львів, вул. Лисенка, 31-а*

ДОСЛІДЖЕННЯ ЕКСПРЕСІЇ ГЕНІВ-ІНДУКТОРІВ ТА ГЕНІВ-СУПРЕСОРИВ АПОПТОЗУ У ПАЦІЄНТІВ З НОВОУТВОРАМИ ТОВСТОЇ КИШКИ, ЯКІ МАЮТЬ СПАДКОВО ОБТЯЖЕНИЙ АНАМНЕЗ ЗА ЦИМ ЗАХВОРЮВАННЯМ

Прогноз онкологічних захворювань залежить від здатності організму до індукції спонтанного апоптозу [1], схильності до апоптозу онкотрансформованих клітин [2] та

ефективності індукції апоптозу злоякісних клітин під дією протипухлинних препаратів [3]. В здоровому дорослому організмі встановлюється баланс між процесами проліферації та загибелі клітин, завдяки якому підтримується клітинний гомеостаз. Пухлинні клітини змінюються фенотипово, отримуючи підвищену здатність до проліферації та втрачаючи здатність до повної диференціації, або апоптичної загибелі. Завдяки цим властивостям вони мають переваги перед клітинами нормальних тканин під час росту і виживання в однакових умовах [цит по 2].

Останнім часом у багатьох країнах світу, в тому числі і в Україні, спостерігається значне зростання захворювання на рак товстої кишки [4,5]. Серед сучасних уявлень про причини виникнення цієї онкопатології важливе місце посідають генетичні фактори [6]. Результати клініко-генеалогічних та цитогенетичних досліджень свідчать про те, що у осіб першого ступеня спорідненості із хворим на колоректальний рак є 2-4 кратний ступінь ризику розвитку аналогічного захворювання [6].

Апоптозу належить найважливіша роль як у фізіологічних, так і у патологічних процесах, оскільки і пригнічення, і неадекватне його посилення призводить до патологічних змін органів і тканин [1,7]. Фактори, регулюючі апоптоз різноманітні, але найбільш цікавими на наш погляд являються трансмембранний глікопротеїн FAS (Apo-1/CD 95), внутріклітинні - P53 та Bcl-2.

Велике значення у виникненні раку товстої кишки надається мутаціям гена-супресора p-53, який розташований на короткому плечі хромосоми 17 і здійснює регуляцію процесів клітинного поділу та контроль за цілісністю геному. Експресія білка P53 не має тканинної специфічності і спостерігається у пухлинах різного генезу, в тому числі і в епітелії товстої кишки [6]. Мутований ген p53 набуває зовсім іншої якості, яка характеризується рядом проявів, такими як затримка проліферації чи її посилення з затримкою супресії пухлинних клітин з прогресивним омолодженням диференціювання, пов'язаної з ним бурхливою прогресією і поганим прогнозом клінічного перебігу хвороби [7]. Мутація гену p53 виявлена майже у всіх типах пухлин людини. Крім активації окремих генів білок P53 здатен пригнічувати експресію антиапоптичних генів, наприклад, виявлено p53-залежне зниження експресії генів bcl-2 і рецептора IGF-1 [7].

Вперше білок Bcl-2 був визначений при дослідженні В-клітинної лімфоми, що і визначило його назву. Білки родини Bcl-2 регулюють мітохондріальний шлях в механізмах запрограмованої смерті клітин і є самими відомими інтрацелюлярними регуляторами апоптоза [8,9]. Саме цими білками контролюється найважливіша-термінальна, незворотня стадія апоптозу-етап деградації ДНК. Індуктори апоптозу та його інгібітори знаходяться в постійній динамічній рівновазі, утворюючи одне з одним гомо-та гетеродимери, а їх співвідношення визначає розвиток апоптозу.

Білок FAS (Apo-1/CD 95) – трансмембранний глікопротеїн, який відноситься до родини бета-рецепторів фактора некроза пухлини і є медіатором апоптоза. Система FAS-FASL відіграє значну роль в елімінації потенційно небезпечних клітин (інфікованих вірусом або трансформованих). Порушення нормальних механізмів апоптоза завжди призводить до порушення динаміки клітинних популяцій і розвитку патологічних станів, що супроводжуються або акумуляцією клітин (пухлинний ріст, аутоімунний процес), або їх втратою. Відповідно, розуміння механізмів апоптоза та розробка методів його об'єктивної детекції дозволять позитивно вплинути на діагностику, лікування і профілактику багатьох захворювань людини.

Враховуючи вищевказане, метою даної роботи було дослідити особливості експресії білків P53, Bcl-2 та FAS у пацієнтів з новоутворами товстої кишки, які мають спадково 3 родичів I-го чи II-го ступенів спорідненості з аналогічним новоутвором. обтяжений анамнез за цими захворюваннями.

Матеріали та методи

Клінічне і генетичне обстеження пацієнтів з раком товстої кишки (РТК)

проводили на базі проктологічного відділення обласної клінічної лікарні м. Львова. Проведено вивчення медичної документації, опитування про стан здоров'я пробандів і їх родичів та генеалогічний аналіз сімей 35 хворих на РТК (з них чоловіків було 20, жінок – 15) віком від 24 до 72 років. Лише у 10 хворих на РТК (з них чоловіків – 6, жінок – 4) віком від 34 до 72 років було виявлено в родоводі від 1 до 3 родичів I-го чи II-го ступенів спорідненості з аналогічним новоутвором.

Матеріалом дослідження були лімфоцити периферійної крові хворих на рак товстої кишки зі спадково обтяженим анамнезом за цим захворюванням. Лімфоцити виділяли в градієнті фікол-верографіну (питома вага = 1,076).

Імуноцистохімічна детекція експресії p53, bcl-2, FAS (Apo-1/CD 95) вивчалася непрямим імунофлуоресцентним методом [10]. Лімфоцити виділяли в градієнті фікол-верографіну (питома вага = 1,076).

Аналіз проводився в УФ світлі, діапазон збудження 360-440 нм, діапазон емісії 480-540 нм. Інтенсивність реакції визначали у відсотках з розрахунку на 200 проаналізованих клітин.

Результати та обговорення.

В усіх досліджених нами зразках, отриманих від 10 пацієнтів з РТК, зі спадково обтяженим анамнезом зареєстровано різний ступінь експресії досліджуваних маркерів в залежності від індивіда (табл 1).

Таблиця 1

Характер експресії P53, Bcl-2 та CD 95 у хворих з новоутворами товстої кишки

Код пацієнта	Діагноз	Показники експресії білка CD 95, %	Показники експресії білка P53, %	Показники експресії білка Bcl-2, %
Контроль	Практично здоровий	29.5	10.8	36.8
1/07	Рак анального каналу та сигмоподібної кишки	33.8	20	24
2/07	Рак прямої кишки	35.8	18.1	47.8
3/07	Рак прямої кишки	39.7	15.8	32
4/07	Рак прямої кишки	60	25	18.1
5/07	Рак сигмоподібної кишки та рак горла	46.7	39.8	23.2
6/07	Рак ректосигмоїдного згину	32	18	36
7/07	Рак прямої кишки	44.3	26	34
8/07	Рак анального каналу	30	33	28
9/07	Рак сигмоподібної кишки	49.7	22	16
10/07	Рак прямої кишки	41.2	35	28

Отримані результати свідчать про те, що лімфоцити периферійної крові хворих на рак кишківника чутливі до апоптозу. Загибель лімфоцитів або ж Т-клітин, може здійснюватися двома основними шляхами. Один з них, FAS-залежний, що контролюється bcl-2 і розвивається у відповідь на зниження концентрації цитокінів. Надлишковий апоптоз лімфоцитів може призводити до зриву захисних механізмів пацієнта. Оскільки bcl-2 є одним з головних регуляторів апоптозу, збільшення його експресії може свідчити про наявність початкових порушень регуляторних механізмів апоптозу у хворих на рак товстої кишки. Здатність пухлинних клітин уникати розпізнавання імунною системою хазяїна є головною умовою розвитку пухлини. В деяких роботах показано, що клітини пухлин різного походження можуть експресувати FASL і індукувати апоптоз в Т-клітинах, експресуючих FAS [7]. При цьому пухлинні клітини можуть експлуатувати внутрішню програму загибелі активованих Т-лімфоцитів, використовуючи саме головну зброю цитотоксичних клітин

- FASL. Деякими авторами показано, що апоптоз FAS-позитивних пухлиноінфільтруючих лімфоцитів при раку шлунка у людини асоціюється зі збільшенням експресії FASL на клітинах карциноми. Аналогічні результати були отримані при дослідженні експресії FASL у людини при колоктеральній карциномі, що узгоджується з отриманими нами результатами. З результатів, наведених в таблиці видно, що у всіх обстежених пацієнтів ми спостерігали збільшення експресії білка P53. Аномалії фактора P53, а також інших внутріклітинних факторів, контролюючих апоптоз, в процесі розвитку пухлини ведуть до її прогресування. Втративши такий контроль, клітини втрачають зв'язок з міжклітинним матриксом та іншими факторами нормального оточення, не гинуть, а успішно розвиваються в чужерідному середовищі, що сприяє метастазуванню пухлин. Це може бути непрямим показником структурно-функціональних змін, які відбуваються у генетичному апараті пухлинних клітин на різних етапах формування та маніфестації злого процесу і, можливо, пов'язані із походженням, механізмом виникнення та типом мутації у гені p53. Результати дослідження p53-залежної індукції апоптозу при наявності інгібіторів синтезу РНК і білків свідчать про те, що існують механізми ініціації білка P53 апоптоза, які не пов'язані з його транскрипційною активністю. Поки що ці механізми практично не вивчені хоча є попередні свідчення, які вказують на здатність p53 безпосередньо взаємодіяти з апоптозасоційованими білками [7].

Висновки.

1. Виявлено збільшення експресії CD95 у пацієнтів з новоутворами товстої кишки, які мають спадково обтяжений анамнез за цими захворюваннями

2. Імуноцитохімічна детекція експресії p53 та bcl-2 у пацієнтів з новоутворами товстої кишки, які мають спадково обтяжений анамнез за цими захворюваннями виявила підвищення цих показників порівняно з контролем..

Отримані в результаті роботи дані свідчать про актуальність роботи та необхідність в подальшому вивченні проблеми.

Література.

1. Упоров А.В., Семиглазов В.Ф., Пожарский К.М. Иммуногистохимическое изучение клеток рака молочной железы с использованием маркеров пролиферации //Архив патологии.-2000.-№2.-С.28-30.
2. Фильченков А.А., Стойка Р.С. Апоптоз и рак .К., "Морион".-1999.-182 с.
3. Dockrell D.H. Apoptosis cell death in pathogenesis of infectious diseases //J.Infect.-2001.-Vol.42.,N4.-P.227-234.
4. Федоренко З.П., Міщенко А.Н., Гулак Л.О. та ін. Розповсюдженість злویкісних новоутворень в популяції України в 1991-1996 рр.(епідеміологічні та організаційні аспекти проблеми).- К.,1997.-118 с.
5. Иоффе А.Ю. Сравнительная иммуногистохимическая характеристика неспецифического язвенного колита и болезни Крона //Врачебное дело.-2005.-№5-6.-С.33-35.
6. Белоусова Е.А. Язвенный колит и болезнь Крона.-М.,Триада,2002.-127 с.
7. Фильченков А.А. Современные технологии количественной оценки апоптоза и их применение в экспериментальной и клинической онкологии. Семинары по гематопатологии. Вып.11.-Киев: ДИА,2003.-76 с.
8. Налескіна Л.А., Воробйова Л.Р., Хома Д.І., Поліщук Л.З., Полійніченко Г.П., Терсенов Я.О., Захарцева Л.М. Особливості експресії білка P53 в епітелії слизової оболонки товстої кишки, враженої поліпами та раком //Цитологія і генетика.-2000.-№1.-С.15-22.
9. Райхин Н.Т., Райхин А.Н. Регуляция и проявление апоптоза в физиологических условиях и в опухолях //Вопросы онкологии.-2002.-Т.48,№2.-С.159-170.
10. Липовець Л.Є., Луцик Б.Д. Посібник з лабораторної імунології.-Львів.-2002.-150 с.

Резюме

Імуноцитохімічна детекція експресії p53 та bcl-2 у пацієнтів з новоутворами товстої кишки, які мають спадково обтяжений анамнез за цими захворюваннями показала значне підвищення цих показників порівняно з контрольними. В результаті проведених досліджень виявлено збільшення експресії CD95 у пацієнтів з новоутворами товстої кишки, які мають спадково обтяжений анамнез за цими захворюваннями..

Имуноцитохимическая детекция экспрессии p53 и bcl-2 у пациентов с новообразованиями толстой кишки, которые имеют наследственно отягощенный анамнез по этому заболеванию, показала увеличение этих показателей по сравнению с нормой. В результате проведенных исследований выявлено увеличение экспрессии CD95 с данным заболеванием.

It was carried out the evaluation of expression of p53, bcl-2 and CD95, using immunocytochemical method in patients with neoplasia of large bowel that have relatives with the same oncopathology in anamnesis. The obtained results showed the increased expression of p53, bcl-2 and CD95 in these patients, comparing with the control group.

ТЕРПИЛЯК О.І.

ДУ Інститут спадкової патології АМН України

Україна, 79000, м. Львів, вул.М.Лисенка, 31а, e-mail:root@ihp.lviv.ua

РОЗПОДІЛ ПОЛІМОРФНИХ ВАРІАНТІВ SNP –1082 G →A ПРОМОТОРНОЇ ДІЛЯНКИ ГЕНА ІЛ–10 ПРИ ВТОРИННОМУ НЕПЛІДДІ

Непліддя це проблема, яка торкається 15% подружніх пар. Причини непліддя – різноманітні і до кінця не з'ясовані. Серед причин непліддя найбільш загадковою є «поведінка» імунітету. Більше того, цілий ряд авторів взагалі вважають, що втрата плоду на ранніх термінах вагітності (вторинне непліддя) має переважно імунну етіологію і базується на зсуві функціонального балансу Т–лімфоцитів–хелперів в бік клітин 1–го типу [1, 2, 3, 4, 5].

Відомо, що реалізація схильності організму до того, чи іншого захворювання відбувається при виключній участі генів імунорегуляторних структур, найбільш визнаними серед яких є цитокіни. Особливий інтерес викликає протизапальний цитокін інтерлейкін–10 (ІЛ–10). Він є одним з найважливіших регуляторних цитокінів, який в значній мірі визначає напрямок імунної відповіді: під впливом ІЛ–10 пригнічується клітинний імунітет, який регулюється Т–хелперами 1–го типу і стимулюється гуморальна відповідь з участю Т–хелперів 2–го типу, що власне і є необхідною умовою нормального протікання вагітності [5, 6]. Промоторна ділянка гена ІЛ–10 (пІЛ–10) містить ряд крапкових нуклеотидних варіацій, які відповідають за високу/низьку експресію ІЛ–10, ці ж SNP (single nucleotide polymorphism) формують алелі схильності до ряду захворювань. Найбільш дослідженими є SNP –1082 G →A, –819 T→C та –592 A→C [7], і зокрема показано, що генотип “високої” експресії –1082 GG асоціюється з мимовільними викиднями [8].

Отже, виходячи з вище сказаного, метою роботи було вивчення особливостей розподілу поліморфних варіантів SNP –1082 G →A промоторної ділянки гена ІЛ–10 в групі подружніх пар з вторинним непліддям, зумовленим мимовільними викиднями.

Матеріали і методи

Матеріалом дослідження служила ДНК, виділена з периферичної крові подружніх пар з вторинним непліддям (ВН). Обстежено 35 індивідів (21 жінка і 14 чоловіків, що склали групу подружніх пар) з вторинним непліддям, в анамнезі котрих було 2–а і більше мимовільних викидні у І триместрі вагітності. Контроль складала 73 практично здорові індивіди із здоровими дітьми.