

© О. В. Харченко

УДК 616 – 07: 616. 33 – 008. 3

О. В. Харченко

ДІАГНОСТИКА ДИСПЛАСТИЧНИХ ЗМІН СЛИЗОВОЇ ОБОЛОНКИ ШЛУНКА ЗА ДОПОМОГОЮ МЕТОДУ ISSR-PCR У ХВОРИХ НА ХРОНІЧНУ ВИРАЗКУ ДВАНАДЦЯТИПАЛОЇ КИШКИ

Полтавський національний педагогічний університет ім. В. Г. Короленка

(м. Полтава)

Дослідження є фрагментом науково-дослідної роботи Харківського національного медичного університету «Формування сучасних методів хірургічного лікування і профілактики ускладнень захворювань і травм органів грудної клітки і черевної порожнини», № держ. реєстрації 0110U002649.

Вступ. Діагностика дисплазії епітелію слизової оболонки шлунка, як передракової зміни є актуальною, але тільки методу біопсії з подальшим гістологічним дослідженням біоптатів недостатньо для вирішення цієї важливої діагностичної проблеми [2, 4]. 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 ДНК різко підвищені [5].

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

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

PCR є універсальною технікою, яку активно використовують з середини 80-х років. Серед численних маркерів, основаних на використанні PCR, особливе місце займають ті, що є фрагментами ДНК, розташованими 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 високо поліморфними 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 з основних 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 в геномі мікросателітів має особливий інтерес завдяки тій ролі, яку вони грають в розвитку онкологічних захворювань [7, 10].

Метою даного дослідження стало вивчення генотипування слизової оболонки шлунка у хворих з хронічною виразкою дванадцятипалої кишки.

Об'єкт і методи дослідження. В роботу покладено результати дослідження 50 спостережень слизової оболонки операційного матеріалу шлунків, що резеційовані з приводу хронічної виразки дванадцятипалої кишки. Для дослідження брали зразки слизової оболонки шлунка з ознаками дисплазії різного ступеня, в якій вивчали зміни ДНК за допомогою полімеразної ланцюгової реакції (PCR), яка є, на наш погляд, найбільш оптимальним молекулярно-біологічним маркером для дослідження [8, 9].

Індивідуальне ДНК-типування (генотипування) зразків слизової оболонки шлунка проводили шляхом ампліфікації ДНК в полімеразній ланцюговій реакції (PCR) з використанням ISSR – праймеру S2, який мав структуру: (AGC)₆G [8].

Ампліфікацію проводили в 25 мкл реакційної суміші, що містила 14 реакційний буфер з трифосфатами, праймер наведеної структури, Tag-полімерази («Тапотілі», ВНДІ генетики, Росія), ДНК додавали в кількості 10 – 20 нг на реакцію. Температура відпалу праймера становила 57°C, синтез фрагментів ДНК проходив в 30 циклах ампліфікації на термоциклері (ампліфікаторі) «Терцик» ТП4-ПЦР 01 («ДНК – технологія», Росія) в режимі: I – 95°–2хв., II – 94°–30с, 57°–2хв, 72°–2хв., III – 72°–10хв. Електрофоретичне розділення продуктів ампліфікації проводили в 2%-му горизонтальному агарозному гелі (Вагофор, Латвія) в 14 ТВЕ-буфері з наступним їх фарбуванням протягом 10 хв в 0,5мкг/мл розчині бромистого етидію і багаторазовою промивкою в проточній воді. Візуалізацію електрофореграм

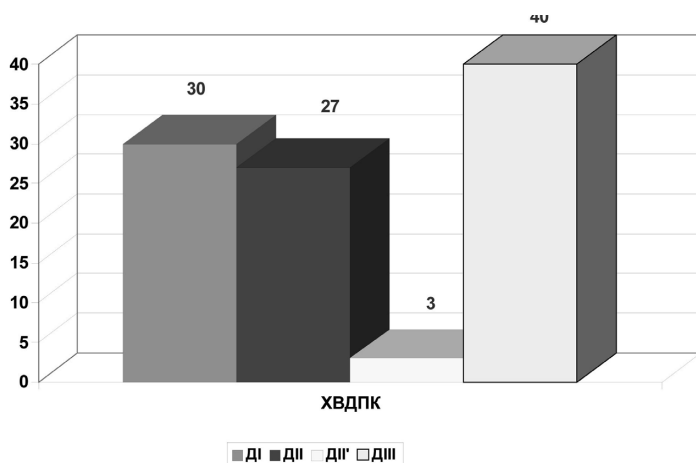


Рис. 1. Розподілення ДНК-профілів слизової оболонки шлунка у хворих з хронічною виразкою дванадцятипалої кишки. Д-I – дисплазія першого ступеня; Д-II – дисплазія другого ступеня першого варіанту; Д-II* – дисплазія другого ступеня другого варіанту; Д-III – дисплазія третього ступеня.

проводили на транслюмінаторі в ультрафіолетовому світлі з довжиною хвилі 365 нм з наступним фотографуванням. Визначення розмірів ампліконів виконували за допомогою маркера молекулярної маси 1000вр DNA-Ledder, рUC 19 DNA/Msp I («Fermentas», Литва) [1].

Результати досліджень та їх обговорення. Генотипування епітелію слизової оболонки шлунка пацієнтів хворих на хронічну виразку дванадцятипалої кишки, виявило різноманітні ампліфикаційні профілі ДНК слизової оболонки шлунка.

Серед різноманіття зразків вдалося згрупувати ДНК-профілі відповідно до фенотипічних ознак і виділити ПЛР-типи за максимумом вираження в кожному випадку (рис. 1).

Профілі маркера слизової оболонки шлунка в нормі містили фрагменти розміром 190, 180, 160, 140, 120, 110, 90, 70, 60 п. н. (пар нуклеотидів) і були ідентичні в межах своєї групи, але суттєво відрізнялись від ДНК-профілів інших досліджуваних груп. ДНК-профілі розміром 220, 210, 200, 190, 180, 160, 140, 120, 110, 100, 90 п. н. відповідали фенотипу дисплазії епітелію першого ступеня (Д-I). Але фенотипи дисплазії епітелію другого ступеня (Д-II) в 90% випадків мали варіант ДНК-профілів розміром 300, 260, 240, 220, 210, 190, 180, 160, 140, 120, 100 п. н. (перший варіант), решта ж мала ДНК-профілі 500, 480, 440, 400, 360, 300, 240, 200, 140, 110, 100 п. н. (другий варіант) (рис. 2), проте фенотипи дисплазії епітелію третього ступеня (Д-III) мали ДНК-профілі тільки одного варіанту розміром 520, 500, 480, 460, 440, 420, 410, 380, 360, 340, 320 п. н. (рис. 3).

ДНК-профілі слизової оболонки шлунка, що відповідали фенотипу Д-I мали певну подібність (63,6% подібності) з маркером норми.

Фенотипу Д-II відповідали два варіанти ДНК-профілів з присутністю ампліконів розміром в межах 500 п. н. та без них. Останні мали значну подібність на рівні 36,4% з ДНК-профілями слизової оболонки шлунка типу Д-III. Це свідчить, що ДНК-профілі Д-II змінюються і мають перехідні форми щодо ПЛР типу Д-III.

ДНК профілі слизової оболонки шлунка з Д-III містили амплікони розміром 520 п. н. і мали генетичну відмінність від

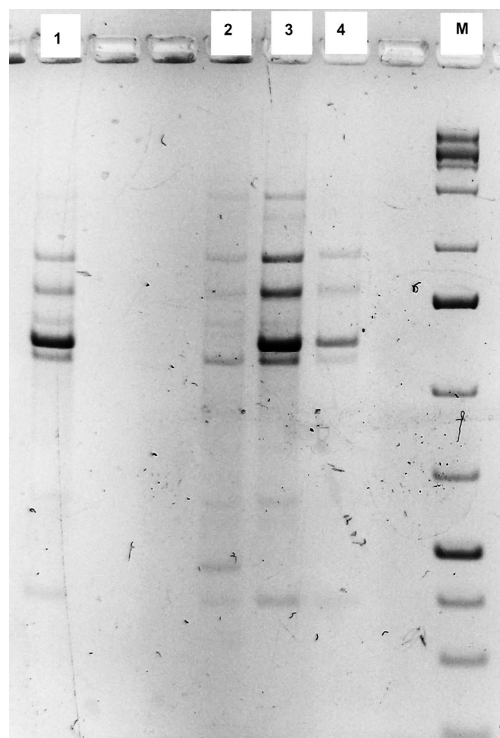


Рис. 2. Електрофореграми продуктів ампліфікату зразків ДНК слизової оболонки шлунка Д-II: 1, 4 – ампліфикаційні профілі Д-II першого варіанту; 2,3 – ампліфикаційні профілі Д-II другого варіанту; М – маркер розміру фрагментів ДНК.

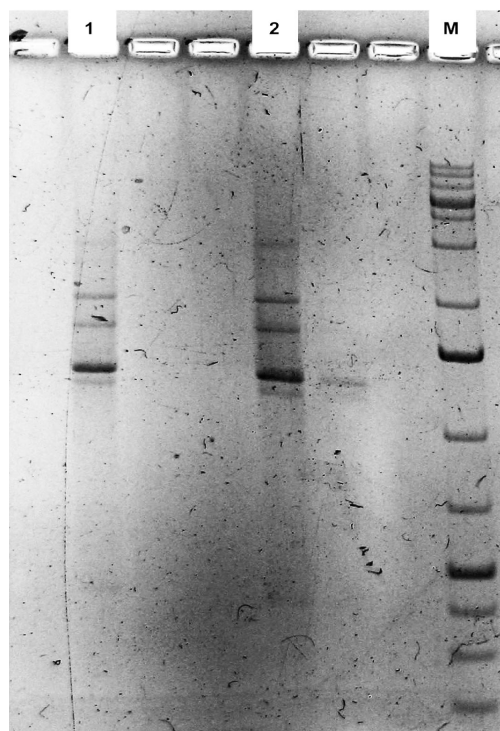


Рис. 3. Електрофореграми продуктів ампліфікату зразків ДНК слизової оболонки шлунка: 1,2 – профілі Д-III; М – маркер розміру фрагментів ДНК.

Таблиця
Результати кореляційного аналізу між показниками дисплазії епітелію слизової оболонки шлунка за фенотипічними ознаками та показниками за результатами генотипування у хворих з хронічною виразкою дванадцятипалої кишки

	Ступінь дисплазії – ДНК-тип min	Ступінь дисплазії – ДНК-тип max
Коефіцієнт кореляції Пірсона r_{xy}	0,863	0,917
Тіснота зв'язку	сильний	дуже сильний
Коефіцієнт детермінації $D=r_{xy}^2$	0,744	0,842
Критичне значення коефіцієнта кореляції з вірогідністю 0,95	0,2732	0,2732
Критичне значення коефіцієнта кореляції з вірогідністю 0,99	0,3511	0,3511
Порівняння коефіцієнта кореляції r_{xy} з критичним (табличним) значенням r_{cr} для значущості 0,95	$r_{xy} > r_{cr}$	$r_{xy} > r_{cr}$
Порівняння коефіцієнта кореляції r_{xy} з критичним (табличним) значенням r_{cr} для значущості 0,99	$r_{xy} > r_{cr}$	$r_{xy} > r_{cr}$
Коефіцієнт коваріації	78,673	100,898
Загальний результат	статистично достовірна залежність з ймовірністю 0,99	статистично достовірна залежність з ймовірністю 0,99

інших груп спостереження, але були подібні в межах своєї групи.

ДНК-профілі за результатами проведення типування методом ISSR-PCR в кожному випадку виявляються за максимальним вираженням дисплазії. Якщо фенотипічно в слизовій оболонці шлунка виявлена одночасно дисплазія від Д-I до Д-III, то результат генотипування відповідатиме максимальному показникові Д-III з ДНК-профілями, що мають амплікони розміром 520 п. н. Амплікаційні профілі Д-II мають два варіанти, але другий варіант має певну подібність до профілів Д-III.

Виявлення певної залежності між показниками ДНК-типування зразків слизової оболонки за методом ISSR-PCR і показниками ступеня вираження дисплазії епітелію слизової оболонки шлунка хворих на хронічну виразку дванадцятипалої кишки за фенотипічними ознаками проведено за допомогою кореляційного аналізу(табл.).

Між ступенем дисплазії епітелію слизової оболонки шлунка за фенотипічними ознаками і показниками ДНК-типування зразків слизової оболонки шлунка коефіцієнт кореляції Пірсона r_{xy} складає відповідно 0,863 і 0,917, що означає сильний і дуже сильний за тіснотою кореляційний зв'язок між показниками. Коефіцієнт детермінації $D=r_{xy}^2$ склав 0,744 і 0,842 відповідно. Критичне значення коефіцієнта кореляції з вірогідністю 0,95 було 0,2732. Критичне значення коефіцієнта кореляції з вірогідністю 0,99 було 0,3511. Порівняння коефіцієнта кореляції r_{xy} з критичним (табличним) значенням r_{cr} для значущості 0,95 відповідало $r_{xy} > r_{cr}$. Порівняння коефіцієнта кореляції r_{xy} з критичним (табличним) значенням

r_{cr} для значущості 0,99 відповідало $r_{xy} > r_{cr}$. Коефіцієнт коваріації був 78,673 та 100,898 відповідно, що дає можливість зробити висновок статистично достовірної залежності між названими показниками з ймовірністю 0,99 (табл.).

Висновки. Дисплазії епітелію слизової оболонки шлунка у хворих з хронічною виразкою дванадцятипалої кишки за результатами генотипування епітелію слизової оболонки шлунка за реакцією ISSR-PCR мають характерні зміни, що знаходяться у відповідній залежності з їхніми ДНК-профілями.

Амплікаційний ДНК-профіль норми має спектр ампліконів розміром в межах від 190 – 60 п. н., дисплазія (Д-I) слабо виражена має амплікаційний ДНК-профіль зі спектром ампліконів розміром від 220 до 60 п. н., дисплазія (Д-II) помірно виражена в 90 % має амплікаційні

ДНК-профілі зі спектром ампліконів розміром 300 – 100 п. н. (I – варіант) та в 10% ДНК-профілі 500 – 100 п. н. (II – варіант), що свідчить про генетичну неоднорідність дисплазій другого ступеня. Дисплазія Д-III має один варіант амплікаційного ДНК-профілю зі спектром ампліконів 520 – 320 п. н. Реакція ISSR-PCR виявляє подовження мікросателітних послідовностей ДНК. Тобто за результатами генотипування епітелію слизової оболонки шлунка ми спостерігаємо мікросателітні експансії. Відомо, що інтенсивне подовження мікросателітних послідовностей за рахунок реплікаційних помилок має назву мікросателітної експансії.

Існує сильний за тіснотою зв'язок між ступенем дисплазії епітелію слизової оболонки шлунка за фенотипічними ознаками і показниками ДНК-типування зразків слизової оболонки шлунка, коефіцієнт кореляції Пірсона r_{xy} склав відповідно 0,863 та 0,917. Загальний результат свідчить про існування статистично достовірної залежності з ймовірністю 0,99.

ISSR-PCR є інформативним методом для виявлення зміни генетичної структури епітелію слизової оболонки шлунка. враховуючи доступність, відносну простоту та можливість візуального зчитування результатів без застосування спеціальної апаратури, з успіхом використаний при вивченні ДНК-типування епітелію слизової оболонки шлунка з фенотипами дисплазій епітелію і дозволяє виявити зміни, які в них відбуваються.

Перспективи подальших досліджень. В подальшому маркер планується дослідити на практиці з метою діагностики неопластичних змін епітелію слизової оболонки шлунка у хворих на виразкову хворобу шлунка.

Література

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. гастроэнтерол., гепатол., колонопроктол. – 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 // Арх. пат. – 2009. – Вып. 5. – С. 17–21.
5. Серов В. В. Ранний рак желудка: морфология, гисто- и морфогенез / В. В. Серов, В. Б. Золотаревский, А. В. Берестова // Арх. патол. – 1990. – № 5. – С. 70–74.
6. 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.
7. Freimer N. B. Microsatellites: evolution and mutational process / N. B. Freimer, M. Slatkin // Ciba Found Symp. – 1996. – № 197. – P. 51–67.
8. Mullis K. B. Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase catalyzed chain reaction / K. B. Mullis, F. Faloona // Meth. Enzymol. – 1987. – № 155. – С. 335–350.
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 [et al.] // Nat. Genet. – 1999. – № 6. – P. 152–156.

УДК 616 – 07: 616. 33 – 008. 3

ДІАГНОСТИКА ДИСПЛАСТИЧНИХ ЗМІН СЛИЗОВОЇ ОБОЛОНКИ ШЛУНКА ЗА ДОПОМОГОЮ МЕТОДУ ISSR-PCR У ХВОРИХ НА ХРОНІЧНУ ВИРАЗКУ ДВНАДЦЯТИПАЛОЇ КИШКИ

Харченко О. В.

Резюме. Діагностика, яка проведена за допомогою реакції ISSR-PCR показала зміни ДНК епітелію слизової оболонки характерні для дисплазії епітелію різного ступеня тяжкості в слизовій оболонці шлунка у пацієнтів, щ які хворіють на хронічну виразку дванадцятипалої кишки. У випадках із указаними дисплазіями відбулися зміни у вигляді збільшення розмірів ампліконів, які характерні для кожної з груп. Указані зміни мають характер мікросателітних експансій. Існує сильний кореляційний зв'язок між ступенем дисплазії, що виявлена за фенотипічними ознаками та показниками характерними для ДНК-типівання епітелію слизової оболонки шлунка. Коефіцієнт кореляції Пірсона r_{xy} склав відповідно 0,863 та 0,917. Загальний результат свідчить про існування статистично достовірної залежності з ймовірністю 0,99.

Ключові слова: ДНК, амплікони, фенотип.

УДК 616 – 07: 616. 33 – 008. 3

ДИАГНОСТИКА ДИСПЛАСТИЧЕСКИХ ИЗМЕНЕНИЙ СЛИЗИСТОЙ ОБОЛОЧКИ ЖЕЛУДКА ПРИ ПОМОЩИ МЕТОДА ISSR-PCR У БОЛЬНЫХ С ХРОНИЧЕСКОЙ ЯЗВОЙ ДВНАДЦАТИПЕРСТНОЙ КИШКИ

Харченко А. В.

Резюме. Диагностика проводимая при помощи реакции ISSR-PCR показала изменения ДНК эпителия слизистой оболочки характерные для дисплазии эпителия разной степени тяжести в слизистой оболочке желудка у пациентов болеющих хронической язвой двенадцатиперстной кишки. В случаях с указанными дисплазиями произошли изменения в виде увеличения размеров ампликонов, характерных для каждой из групп. Указанные изменения носят характер микросателлитных экспансий. Существует сильная корреляционная связь между степенью дисплазии определяемой по фенотипическим признакам и показателями характерными для ДНК-типирования эпителия слизистой оболочки желудка. Коэффициент корреляции Пирсона r_{xy} составил соответственно 0,863 и 0,917. Общий результат свидетельствует о существовании статистически достоверной зависимости с вероятностью 0,99.

Ключевые слова: ДНК, ампликоны, фенотип.

UDC 616 – 07: 616. 33 – 008. 3

Diagnosis of Dysplastic Changes of Gastric Mucosa by the ISSR-PCR in Patients with Chronic Duodenal Ulcer

Kharchenko A. V.

Abstract. Diagnosis, made by the ISSR-PCR reaction, has shown mucosal epithelial DNA changes specific to the epithelial dysplasia of varied severity in gastric mucosa in patients with chronic duodenal ulcer.

Ampligated profiles of normal gastric mucosa marker enclosed fragments measuring 190 – 60 p. n. (pairs of nucleotides) and were identical within its group and significantly differed from the DNA-profiles of other subject groups. The DNA-profiles measured 220 – 90 p. n. corresponded to phenotype of

Stage I epithelial dysplasia (D-I). Stage II epithelial dysplasia (D-II) phenotypes in 90 % of cases possessed the variant of DNA-profiles measured 300 – 100 p. n. (the first variant) and the rest ones had the DNA-profiles measured

500 – 100 p. n. (the second variant). Stage III epithelial dysplasia (D-III) phenotypes had the DNA-profiles of single variant, measured 520 – 320 p. n.

D-II phenotype corresponded to two variants of DNA-profiles, containing amplicones measured within 500 p. n. and without them. The latter in 36,4 % resembled DNA-profiles of Type III gastric mucosa. It makes evident that D-II DNA-profiles are changing and have transitional forms to D-III DNA-profiles.

In cases with abovementioned dysplasia, changes in the form of enlargement of amplicones, specific to each group, have been observed. These changes are characterized as microsatellite expansion.

Genetic typing of gastric mucosa epithelium, made by the ISSR – PCR reaction found that gastric mucosa epithelial dysplasias in patients with chronic duodenal ulcer had undergone specific changes, related to their correspondent DNA-profiles.

Amplificated normal DNA-profile has the spectrum of amplicones measured within 190 – 60 p. n. ; low-grade dysplasia (D-I) has amplificated DNA-profile with spectrum of amplicones measured from 220 to 60 p. n. ; medium-grade dysplasia (D-II) in 90 % has amplificated DNA-profile with spectrum of amplicones measured 300 – 100 p. n. (I – variant) and in 10 % has DNA-profile of 500 – 100 p. n. (II – variant), indicating about heterogeneity of Stage II dysplasias. D-III dysplasia has single variant of amplificated DNA-profile with spectrum of amplicones measured 520 – 320 p. n. The ISSR – PCR reaction made extension of microsatellite DNA-sequences evident. That is, the results of genetic typing of gastric mucosa epithelium founded microsatellite expansions. It is known that that intensive extension of microsatellite sequences due to replicative errors is called microsatellite expansions.

There is strong correlation between the stage of gastric mucosa epithelial dysplasia on phenotypical characteristics and indices of DNA-typing of gastric mucosa samples; Pearson correlation coefficient r_{xy} was 0,863 and 0,917, respectively. The total results founded the existences of statistically significant dependence with 0,99 probability.

The ISSR – PCR reaction is the informative method to detect change of gastric mucosa epithelium genetic structure. Taking into account the availability, relative simplicity and possibility of visual reading of the results without special equipment it has been successfully used while studying the DNA-typing of gastric mucosa epithelium with phenotypes of epithelial dysplasia, providing with detection of change, they are experiencing.

Key words: DNA, amplicones, phenotype.

Рецензент – проф. Баштан В. П.

Стаття надійшла 10. 02. 2014 р.