healthy male subjects // Circulation. — 1996. — N 94. — P. 3257-3262.

8. *Guidelines* committee. 2003 European Society of Hypertension- European Society of Cardiology guidelines for the management of arterial hypertension. // J. Hypertens. — 2003. — N 21. — P. 1011-1053.

9. *Hirofumi Tanaka.* Age-Related Increase in Femoral Intima-Media Thickness in Healthy Humans // Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology. — 2000. — N 20. — P. 2172.

10. *Jonathan M. Sorof, Andrei V. Alexandrov, Gina Cardwell.* Carotid Artery Intimal-Medial Thickness and Left Ventricular Hypertrophy in Children With Elevated Blood Pressure // PEDIATRICS. — 2003. — Vol. 111, N 1. — P. 61-66.

11. *Rates* and determinants of site-specific progression of carotid artery intima-media thickness: the carotid atherosclerosis progression study / A. D. Mackinnon, P. Jerrard-Dunne, M. Sitzer et al. // Stroke. — 2004. — N 35. — P. 2150-2154.

12. *Intimal* plus medial thickness of the arterial wall: a direct measurement with ultrasound imaging / P. Pignoli, E. Tremoli, A. Poli et al. // Circulation. — 1986. — N 74. — P. 1399-1406.

13. *Cardiac* and Vascular Remodeling in Older Adults With Borderline Isolated Systolic Hypertension / Riccardo Pini, M. Chiara Cavallini, Francesca Bencini et al. // Hypertension. — 2001. — N 38. — P. 1372.

14. *Parallel* cardiac and vascular adaptation in hypertension / M. J. Roman, P. S. Saba, R. Pini et al. // Circulation. — 1992. — Vol. 86. — P. 1909-1918.

15. Relation of hemodynamics and risk factors to ventricular-vascular interactions in the elderly: the Cardiovascular Health Study / Simone de, Giovanni a; McClelland, Robyn b; Gottdiener, John S. c et al. // Journal of Hypertension. — 2001. — Vol. 19, N 10. — P. 1893-1903.

УДК 618.19-006.55:577.212.3

В. П. Доменюк[1], К. В. Літовкін[1], В. В. Бубнов[1], Т. Г. Вербицька[1], С. В. Бондар[2]

АНАЛІЗ МІНЛИВОСТІ ПРОМОТОРНИХ ДІЛЯНОК ГЕНІВ *ERα, ERβ, PR, CX26* У ХВОРИХ НА РАК МОЛОЧНОЇ ЗАЛОЗИ

[1]Одеський державний медичний університет,
[2]Одеський обласний онкологічний диспансер

Рак молочної залози (РМЗ) в Україні, як і в країнах Європи та Америки, посідає перше місце у структурі захворюваності та летальності від злоякісних новоутворень серед жінок. В останні роки спостерігається перехід до індивідуалізації терапії, тобто враховуються фактори прогнозу перебігу захворювання й ефекту від лікування [1].

Серед прогностичних факторів РМЗ широко відомі рецептори естрогенів і прогестеронів, наявність яких, навіть без застосування терапії, свідчить про неагресивний тип розвитку захворювання. Перспективним вважається перехід з імуногістохімічного рівня прогнозування на молекулярно-генетичний, що грунтується на зв'язку поліморфізму саме у структурі генів із розвитком РМЗ. Найбільш відомими ДНК-маркерами є поліморфні ділянки гена *BRCA, p53, bcl-2*. Перспективними для розробки вважаються маркери на гени *ER, PR*, *Cx26*. Зокрема, експресія гена *ERα* використовується у клінічній практиці як індикатор добору гормональної терапії, а її втрата асоційована з поганою виживаністю [2]. Сьогодні відомо кілька варіантів поліморфізму гена *ERα*, що змінюють функцію рецептора: поліморфізм PvuII, XbaI і (GT)n пов'язані з ризиком РМЗ [3]. Однак не можна робити прямої екстраполяції зв'язку поліморфізму з ризиком РМЗ на летальність, такі припущення потребують подальших досліджень [2; 3].

Поліморфізм гена рецептора прогестерону за довжиною фрагментів рестрикції TaqI в інтроні G був описаний у зв'язку з карциномою яєчників, а нещодавно з'явилися дані про його асоціацію зі зменшенням ризику РМЗ. Втрата гетерозиготності у хромосомному регіоні 11q22-23, де локалізований *PR*, часто спостерігалася при РМЗ, засвідчуючи присутність у цій ділянці гена-супресора пухлини. У дослідженні [4] перевірено можливість участі вказаних типів поліморфізму в розвитку РМЗ у популяції австрійок. Показано відсутність асоціації між поліморфізмом гена *PR* і клінічними даними щодо типу пухлини, її розміру, ступеня диференціації тощо.

Рівень експресії гена-супресора пухлини *Cx26* є суттєво нижчим у пухлинах порівняно з нормою (43 %) [5], що дозволяє використати цей ген як маркер для прогнозування та відбору групи високого ризику для відповідної стратегії лікування. Рівень експресії гена *Cx26* є зниженим у пухлинах РМЗ з причини метилування його промотора, найбільш частого у Sp1 сайті [6]. Однак майже немає інформації щодо генних альтерацій *Cx26* та їхнього можливого зв'язку з РМЗ.

Враховуючи викладену актуальність досліджень молекулярно-генетичного поліморфізму генів *ERα, ERβ, PR, Cx26* у зв'язку з розвитком РМЗ, зокрема в Одеському регіоні, а також недостатність існуючих сьогодні експериментальних даних, нами була запланована ця пошукова робота. **Мета** нашого дослідження — детекція по-

ліморфізму промоторних ділянок генів *ERα (A, B, C), ERβ, PR (A, B), Cx26* у хворих на РМЗ Півдня України.

Матеріали та методи дослідження

Тканину РМЗ із контрольними зразками здорової тканини отримано від 30 хворих мамологічного відділення Одеського обласного онкологічного диспансеру.

Виділяли ДНК із зразків тканини за допомогою набору "DNA purificaton kit" (Promega). Кількість та якість виділених препаратів ДНК оцінювали електрофорезом у агарозному гелі та спектрофотометрично.

ПЛР-секвенування: на першому етапі нагромаджували поліморфний фрагмент ДНК із привіском послідовності фага М13 (5′-TGT AAA ACG ACG GCC AGT-3') за допомогою праймерів, спрямованих у промоторні ділянки генів *ERα (A, B, C), ERβ, PR (A, B), Cx26* (таблиця).

Для реакції використовували суміш об'ємом 10 мкл. Склад реакційної суміші: 20–50 нг хромосомної ДНК; 4–6 рМ праймера з привіском М13; 200 мкМ dNTPs; 50 мМ KCl; 2,5 мМ $MgCl_2$; 10 мМ Tris-HCl (pH 8,3); 1,5 % DMSO; 50 мМ TMAC; 0,2 U Tfi-полімерази.

Якість ПЛР-продукту оцінювали в агарозному гелі, після чого вирізали його і здійснювали екстрагування/чистку за допомогою набору "GFXTM PCR DNA and Gel Band Purification Kit" (AmERsham Pharmacia Biotech).

На другому етапі проводили термінуючу реакцію секвенування за допомогою набору "ThERmoSequenase 7-deaza-dGTP Sequencing Kit" (AmERsham Pharmacia Biotech) з універсальним праймером М13. Умови реакції (20 циклів): 95 °С — 30 с, 54 °С — 30 с, 72 °С — 1 хв. Після реакції суміш денатурували протягом 3 хв при 72 °С у IR2 стопрозчині та наносили у 25 см секвенуючий гель. Аналізували продукти секвенування за допомогою програми "Base ImagIR 4.0". Для пошуку гомології секвенованого фрагмента в базі даних геному людини використано інтернет-програму "NCBI BLAST" (http://130.14.29.110/BLAST/).

Результати дослідження та їх обговорення

Виконано секвенування промоторних регіонів генів *ERα* у ділянках А, В, С; *ERβ; PR* (А, В), *Cx26*. У результаті аналізу для генів *ERα B, ERα C, PRA, PRB, Cx26* не виявлено відмінностей у нуклеотидних послідовностях як між генотипами, так і у межах генотипу між пухлиною та нормою. Ідентичність нуклеотидного складу порівнюваних зразків за вказаними локусами цілком відповідає даним літератури про відсутність генних альтерацій за цими локусами, пов'язаних із РМЗ.

При аналізі промоторного регіону гена *ERαA* виявлено однонуклеотидний поліморфізм (SNP) T/C у положенні 341 (послідовність праймера відокремлена |): GGA CAC GGT CTG CAC CCT GCC CGC| GGC CAC GGA CCA TGA CCA TGA CCC TCC ACA CCA AAG CAT C[T/C]G GGA TGG CCC TAC TGC ATC AGA TCC AAG G (рис. 1).

Згідно з базою даних геному людини, гаплотип «Т» є нормальною послідовністю гена естрогенового рецептора, тимчасом як гаплотип «С» є варіантом *ER*, отриманим при аналізі mRNA з тканини РМЗ.

У нашій популяції поліморфізм такого типу встановлено у

Таблиця

Нуклеотидні послідовності праймерів та умови полімеразної ланцюгової реакції

Праймер	Послідовність	Температура та тривалість гібридизації, °С, с
ERαA – f	5'-TGT AAA ACG ACG GCC AGT GGA CAC GGT CTG CAC CTG CCC GC-3'	71, 30
ERαA – r	5'-GCG GAC GGT TGA GGG GCT CCA GCT-3'	
ERαB – f	5'-TGT AAA ACG ACG GCC AGT CCC ACT GCC ATT CAT CCA GC-3'	60, 30
ERαB – r	5'-AGG AAT GTG CTC GCA TGT GCG-3'	
ERαC – f	5'-TGT AAA ACG ACG GCC AGT CTT CAC ATT CTC CGG GAC TGC-3'	61, 30
ERαC – r	5'-GAA GGC TCA GAA ACC GGC G-3'	
ERβ – f	5'-TGT AAA ACG ACG GCC AGT CTT GGA AGG TGG GCC TGG TC-3'	60, 30
ERβ – r	5'-CGC ATA CAG ATG TGA TAA CTG GCG-3'	
PRA – f	5'-TGT AAA ACG ACG GCC AGT ACG GGC TAC TCT TCC CTC G-3'	61, 30
PRA – r	5'-TGG AAT ATG CGC CCT CCA CG-3'	
PRB – f	5'-TGT AAA ACG ACG GCC AGT TGA CTG TCG CCC GCA GTA CG-3'	60, 30
PRB – r	5'-CGG CAA TTT AGT GAC ACG CG-3'	
Cx26 – f	5'-TGT AAA ACG ACG GCC AGT GAT TTA ATC CAT GAC AAA CT-3'	53, 30
Cx26 – r	5'-CCA CAC CTC CTT TGC AGC-3'	

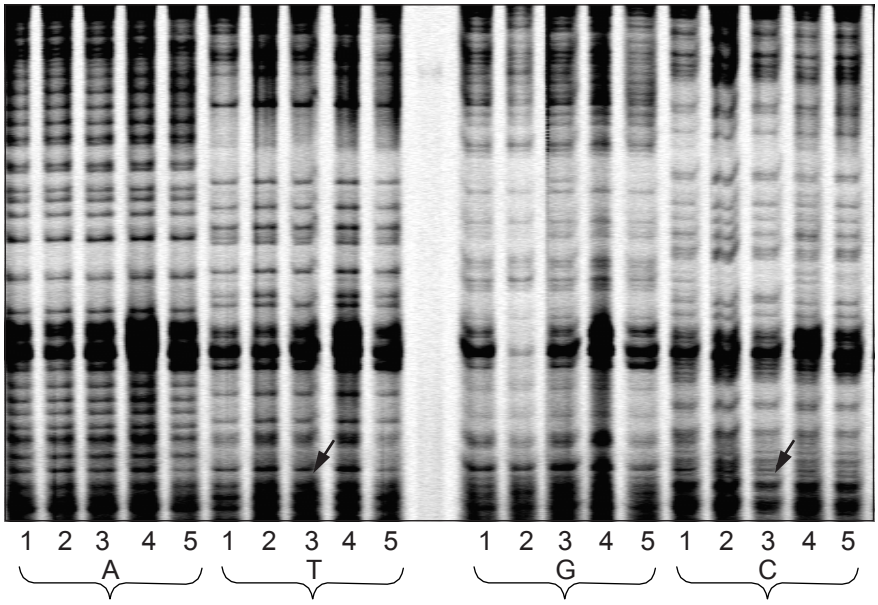

Рис. 1. Електрофореграма продуктів секвенуючої реакції промоторної ділянки гена *ERα*A

Примітка. Для полегшення порівняння зразки згруповані за реакціями термінації одного типу (окремо за A, T, G, C). Порядок нанесення зразків кожної групи однаковий: *1* — 33р, *2* — 35н, *3* — 35р, *4* — 37р, *5* — 20н, де н — зразок ДНК із норми, р — із пухлини. Стрілками показано відсутність фрагмента у зразку 35р (реакція Т) та його наявність у 35р (реакція С).

6 % випадків РМЗ. З літератури відомо кілька SNP у структурі самого гена *ERαA* [7], однак немає однозначної асоціації випадків поліморфізму поодиноких локусів із РМЗ.

Гаплотипний аналіз показав, що детектований нами SNP у поєднанні з варіантами 454–351A → G або 454–397C → T та 975C → G SNPs може бути пов'язаний зі зростанням ризику виникнення РМЗ дуктального типу. Крім того, поєднання цих гаплотипів у різних співвідношеннях інформативніші щодо ризику РМЗ для жінок із більшим індексом маси тіла [7].

У нашому дослідженні двох із цих гаплотипів не виявлено, а третій знаходився за межами секвенованого фрагмента. Враховуючи також низький відсоток зустрічальності SNP 341T/C у популяції хворих Півдня України, не можна вважати даний тип поліморфізму індикатором ризику виникнення РМЗ, але ця можливість з'являється при нагромадженні в цьому регіоні кількох відомих SNP-гаплотипів.

При аналізі промоторного регіону гена *ERβ* виявлено мутацію, ймовірно, за типом інсерції. Попередня оцінка якості вираженості та кількості отриманого продукту ампліфікації виявила наявність трьох алелів у популяції хворих із РМЗ: 123–123 п. н., 123–177 п. н., 177–177 п. н. (рис. 2). Після секвенування кожного з фрагментів окремо, виявлено їхню ідентичність до позиції 715 включно (згідно з номенклатурою GenBank, EMBL, DDBJ, PDB), після якої верхній фрагмент подовжується ще на 50 нуклеотидів. Спостерігається більша зустрічальність алеля «177–» серед зразків пухлин — 67 %, алель «177–177» та 83 % спільно з гетерозиготними генотипами «123–177». Однак висновок про певну асоціацію в успадкуванні може бути зроблений після проведення мікродисекційного розділення клітин раку та норми перед виділенням ДНК.

Здійснено пошук даних літератури щодо існування мутацій за типом інсерцій у межах гена *ERβ,* а також їхнього можливого зв'язку із ризиком виникнення РМЗ. У кількох дослідженнях [8] виявлено нову ізоформу *ERβ*, що з'являється внаслідок інсерції 54 нуклеотидів у положенні 1372, яка сьогодні відома під назвою *ERβ2*. Функцією *ERβ2* є негативна регуляція естрогенової дії. Проте виявлена нами інсерція знаходиться у позиції до 800, тимчасом як відома в літературі починається з 1372 (1374 — за іншими даними).

Висновки

У результаті дослідження, проведеного у хворих на РМЗ з популяції Півдня України, виявлена відсутність поліморфізму у локусах *ERα*, *ERβ, PR, Cx26*, асоційованого з ризиком РМЗ, що відповідає сучасним даним літератури.

В обстежених хворих нами виявлено відомий однонуклео-

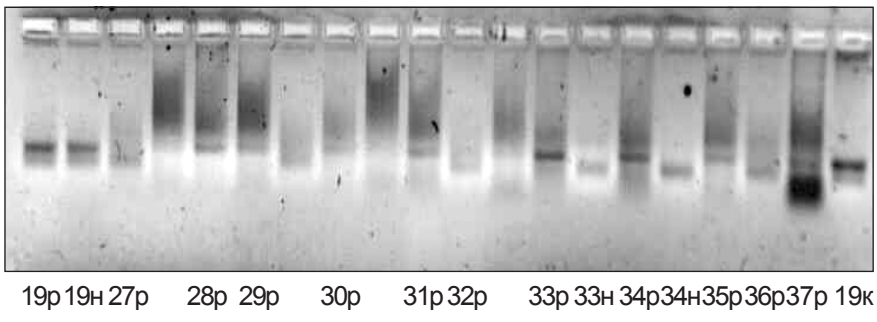

Рис. 2. Електрофореграма продуктів апмліфікації ДНК локусу ERβ

Примітка. Цифрами позначено зразки ДНК різних хворих із РМЗ. Зразки «н» — ДНК, виділена з нормальної тканини; «р» — ДНК із пухлини; «к» — ДНК із крові.

тидний поліморфізм у промоторному регіоні *ERαA*, що має певний зв'язок із розвитком РМЗ, але лише у поєднанні з кількома SNP у цьому ж регіоні. Необхідно провести подальші дослідження цієї закономірності щодо захворювання на РМЗ у жінок Півдня України.

Виявлена нами інсерція у промоторному регіоні *ERβ* (не була раніше описана в літературі) має бути досліджена детальніше на мікродисектованих зразках, оскільки можлива її асоціація з наявністю РМЗ.

ЛІТЕРАТУРА

1. *Факторы* прогноза при раке молочной железы / А. А. Божок, В. Ф. Семиглазов, В. В. Семиглазов и др. // Клин. онкология. — 2005. — Т. 7, № 1. — С. 1-10.

2. *Jensen E. V., Jordan V. C.* The estrogen receptor: a model for molecular medicine // Clinical Cancer Research. — 2003. — Vol. 9. — P. 1980-1989.

3. *Association* of breast cancer risk with a GT dinucleotide repeat polymorphism upstream of the estrogen receptor-α gene / Q. Cai, Y. T. Gao, W. Wen et al. // Cancer Research. — 2003. — Vol. 63. — P. 5727-5730.

4. *Human* progesterone receptor gene polymorphism PROGINS and risk for breast cancer in Austrian women / G. Fabjani, D. Tong, K. Czerwenka et al. // Breast Cancer Research and Treatment. — 2002. — Vol. 72, N 2. — P. 131-137.

5. *Li Z.* Investigate the relationship among the expression of *Cx43, Cx26, VEGF-C, ER, PR* and the clinicopathological characteristics in breast carcinoma // Chinese Electronic Periodical Services. — 2005. — Vol. 17, N 5. — P. 291-294.

6. *Tan L., Bianco T., Dobrovic A.* Variable promoter region CpG island methylation of the putative tumor suppressor gene *Connexin 26* in breast cancer // Carcinogenesis. — 2002. — Vol. 23, N 2. — P. 231-236.

7. *Oestrogen* receptor α gene haplotype and postmenopausal breast cancer risk: a case control study / S. Wedren, L. Lovmar, K. Humphreys et al. // Breast Cancer Res. — 2004. — Vol. 6, N 4. — P. 437-449.

8. *A novel* isoform of rat estrogen receptor beta with 18 amino acid insertion in the ligand binding domain as a putative dominant negative regulator of estrogen action / K. Maruyama, H. Endoh, H. Sasaki-Iwaoka et al. // Biochemical and Biophysical Communications. — 1998. — Vol. 246, N 1. — P. 142-147.

УДК 618.3-06:616.15

В. М. Запорожан, В. І. Лінніков

ГІПЕРГОМОЦИСТЕЇНЕМІЯ І УСКЛАДНЕНИЙ ПЕРЕБІГ ВАГІТНОСТІ

Одеський державний медичний університет

Найважливішу роль у виникненні артеріальних і венозних тромбозів, а також тромбоемболії відіграють набуті та генетично зумовлені причини тромбофілії, до яких належать набута й генетично детермінована гіпергомоцистеїнемія (ГГЦ), антифосфоліпідний синдром і генетичні мутації факторів згортання або генетично зумовлені дефіцити інгібіторів згортання: мутація фактора V Leiden, мутація протромбіну, дефіцити АТ III, протеїнів С, S та ін. Ризик тромбоемболічних ускладнень під час вагітності за наявності в анамнезі тромбофілії, підвищується в десятки разів.

Гіпергомоцистеїнемія стоїть осторонь у цьому переліку. На відміну від інших форм генетичної тромбофілії, при ГГЦ немає початкових порушень у системі гемостазу, вони розвиваються опосередковано, при розладі ферментних систем, нагромадженні гомоцистеїну в плазмі крові, розвитку окиснювального стресу тощо. При цьому ГГЦ є незалежним фактором ризику розвитку рецидивного венозного тромбоемболізму (незалежно від віку, статі, наявності мутації фактора V Leiden, протромбіну G20210A та ін.) [1; 5].

То що ж таке ГГЦ і яка її роль у розвитку основних форм акушерської патології?

Гомоцистеїн є сірковмісною амінокислотою, обмін якої нерозривно пов'язаний з обміном незамінної кислоти метіоніну та цистеїну в організмі. Гомоцистеїн бере активну участь в окисно-відновних реакціях і здатний до автоокиснення. Поза клітиною гомоцистеїн знаходиться переважно в окисненій формі (1 %) або у зв'язаному з білками стані (70 %).

У нормі концентрація гомоцистеїну в крові становить 12–14 мкмоль/л. При підвищенні концентрації гомоцистеїну слід виділяти помірну (15–30 мкмоль/л), середньої тяжкості (30–100 мкмоль/л) та тяжку (більше 100 мкмоль/л) ГГЦ [4].

В ендотеліальних клітинах ГГЦ стимулює утворення вільних радикалів у ендотеліоцитах, що призводить до зниження синтезу простацикліну. Таким чином, формується судинний компонент тромбофілії. Гомоцистеїн у підвищених концентраціях здатний спричинити склерозуючий, тромбоутворювальний і атерогенний вплив на кровоносні судини [2].

Обмін гомоцистеїну нерозривно пов'язаний з метіоніновим