

зовался сульпірид, в то время как дроперидол не улучшал показателей кардиотоксического действия психотропного препарата на сократительный аппарат кардиомиоцитов предсердий.

**Ключевые слова:** нейролептики, экспериментальный психоз, миофибриллы, кардиомиоциты, предсердия.

Стаття надійшла 27.02.2014 р.

cardiotropic effect have had sulphiride, while droperidol does not improved cardiotoxicity effect of psychotropic drug on the contractile apparatus of atrial cardiomyocytes.

**Key words:** antipsychotic drugs, experimental psychosis, myofibrils, cardiomyocytes, the atria.

Рецензент Стеченко Л.О.

УДК 611.018.7.019 : (616.342 : 616 – 002.2+616.33+616.33– 006) : 616 – 052

О. В. Харченко

Полтавський національний педагогічний університет ім. В.Г. Короленка, м. Полтава

## ПОРІВНЯЛЬНА ХАРАКТЕРИСТИКА РЕЗУЛЬТАТІВ ГЕНОТИПУВАННЯ ЕПІТЕЛІО СЛИЗОВОЇ ОБОЛОНКИ ШЛУНКА

Проведена порівняльна характеристика діагностики слизової оболонки шлунка, за допомогою реакції ISSR-PCR, у пацієнтів, які хворіють на хронічну виразку дванадцятипалої кишки, шлунка та виразково-інфільтративний рак шлунка. Дослідження показали зміни ДНК слизової оболонки шлунка характерні для цих нозологічних груп. У випадках із дисплазіями різного ступеня вираження відбулися зміни у вигляді збільшення розмірів ампліконів. Описані зміни мають характер мікросателітних експансій. За результатами генотипування епітелію слизової оболонки шлунка за реакцією ISSR-PCR пацієнтів з хронічною виразкою дванадцятипалої кишки, шлунка і виразковим раком шлунка виявлено, що характерні для дисплазії зміни при них знаходяться в відповідній залежності з їхніми ДНК-профілями. Амплікаційний ДНК-профіль норми має спектр ампліконів розміром в межах 190 – 60 п.н нуклеотидів, дисплазія (Д-I) слабо виражена має амплікаційний ДНК-профіль зі спектром ампліконів розміром від 220 до 60 п.н., дисплазія (Д-II) помірно виражена має два варіанти амплікаційних ДНК-профілів зі спектром ампліконів розміром 300 – 100 п.н.(I - варіант) та 500 – 100п.н.(II – варіант), дисплазія Д-III при хронічній виразці дванадцятиперної кишки має один варіант амплікаційного ДНК-профілю зі спектром ампліконів розміром 520 – 320 п.н., дисплазія Д-III при хронічній виразці шлунка має два варіанти амплікаційних ДНК-профілів розміром 600 – 320 п.н.(I - варіант) та 620 – 440 п.н.(II – варіант).

**Ключові слова:** ДНК, амплікони, фенотип.

*Робота є фрагментом НДР «Формування сучасних методів хірургічного лікування і профілактики ускладнень захворювань і травм органів грудної клітки і черевної порожнини» (№ держреєстрації 0110U002649).*

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 [1, 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 злоякісна 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 злоякісних 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** роботи було вивчення відмінностей результатів генотипування слизової оболонки шлунка у хворих на хронічну виразку дванадцятипалої кишки, шлунка та виразково-інфільтративний рак шлунка.

**Матеріал та методи дослідження.** В роботі використано результати дослідження 150 спостережень операційного матеріалу шлунків, що резеційовані з приводу виразкових форм раку – 50, хронічної виразки шлунка – 50, хронічної виразки дванадцятипалої кишки – 50.

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)<sub>6</sub>G [8].

Ампліфікацію проводили в 25 мкл реакційної суміші, що містила 1× реакційний буфер з трифосфатами, праймер наведеної структури, Tag-полімеразу («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) «Герцик» ТП4-ППР 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 1× ТВЕ-буфері з наступним їх фарбуванням протягом 10 хв в 0,5мкг/мл розчині бромистого етидію і багаторазовою промивкою в проточній воді. Візуалізацію електрофореграм 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-Ladder, рUC 19 DNA/ Msp I («Fermentas», Литва) [2].

**Результати дослідження та їх обговорення.** Серед різноманіття зразків вдалося згрупувати ДНК-профілі відповідно до фенотипічних ознак і виділити ПЛР-типи за максимумом вираження в кожному випадку. Але серед нозологічних груп ДНК-профілі дещо відрізнялись від аналогічних в своїй групі. Профілі маркеру слизової оболонки шлунка в нормі містили фрагменти розміром 190, 180, 160, 140, 120, 110, 90, 70, 60 п.н.(пар нуклеотидів) та були ідентичні в межах своєї групи і суттєво відрізнялись від ДНК-профілів інших досліджуваних груп.

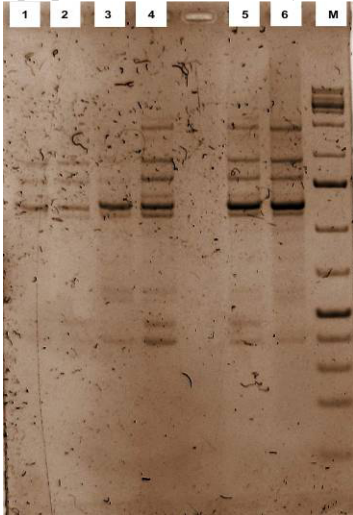


Рис. 1. Електрофореграми продуктів ампліфікату зразків ДНК слизової оболонки шлунка: 1 – ДНК-профілі слизової оболонки шлунка Д-II другий варіант пацієнтів з хронічною виразкою дванадцятипалої кишки; 2 – ДНК-профілі слизової оболонки шлунка Д-III пацієнтів з хронічною виразкою дванадцятипалої кишки; 3 – ДНК-профілі слизової оболонки шлунка Д-III перший варіант пацієнтів з хронічною виразкою шлунка; 4 – ДНК-профілі слизової оболонки шлунка Д-III другий варіант пацієнтів з хронічною виразкою шлунка; 5,6 – ДНК-профілі слизової оболонки шлунка пацієнтів з виразково-інфільтративним раком шлунка; М – маркер розміру фрагментів ДНК.

ДНК-профілі слизової оболонки шлунка з дисплазією першого ступеня (Д-I) мали 63,6% подібності з маркером норми. Але ДНК-профілі, що за фенотипічними ознаками відповідали Д-I при хронічній виразці дванадцятипалої кишки відрізнялись від таких при хронічній виразці шлунка на 36,3%. ДНК-профілі що відповідали фенотипічним ознакам дисплазії другого ступеня (Д-II) також відрізнялись, профілі першого типу при хронічній виразці дванадцятипалої кишки відрізнялись від таких при хронічній виразці шлунка на 18,2%, тоді як профілі другого типу відрізнялись від аналогічних на 45,4%. Фенотипу Д-II при хронічній виразці дванадцятипалої кишки відповідали два варіанти ДНК-профілів з присутністю ампліконів розміром в межах 500 п.н.(рис.1.№1) та без них. Ці профілі мали значну подібність на рівні 36,4% з ДНК-профілями слизової оболонки шлунка дисплазії третього ступеня (Д-III). Це свідчить, що ДНК-профілі Д-II лабільні і мають перехідні форми щодо ПЛР типу Д-III.

При хронічній виразці дванадцятипалої кишки Д-III виявлені ДНК-профілі тільки одного варіанту (520, 500, 480, 460, 440, 420, 410, 380, 360,340,320 п.н.) (рис.1.№2), тоді як при хронічній виразці шлунка знайдені профілі двох варіантів: перший розміром – 560, 540, 520, 500, 480, 460, 420, 410, 340, 320, 310 п.н.( рис.1. №3) і другий – 600, 580, 560, 540, 520, 500, 480, 460, 440, 420, 410 п.н.(рис.1. №4).

ДНК профілі слизової оболонки шлунка Д-III як при хронічній виразці дванадцятипалої кишки так і при хронічній виразці шлунка мали амплікони розміром 520 п.н. і вище. ДНК-профілі слизової оболонки шлунка Д-II містили два варіанти з присутністю ампліконів розміром 320 п.н. та 520 п.н. Останні мали значну подібність на рівні 63,6% з першим варіантом ДНК-профілів слизової оболонки шлунка типу Д-III. Цей факт підтверджує, що ДНК-профілі Д-II змінюються і мають перехідні форми щодо ПЛР типу Д-III. В ДНК-профілях слизової оболонки шлунка Д-III переважали амплікони розміром від 520 п.н. до 620 п.н. і мали значну генетичну відмінність від інших груп спостереження і повністю відрізняється від норми, але досить високий ступінь подібності (72,7%) в межах своєї групи.

ДНК-профілі за результатами проведення типування методом ISSR-PCR в кожному випадку виявляються за максимальним вираженням дисплазії. Тобто, якщо фенотипічно в слизовій оболонці виявлено одночасно дисплазія від Д-I до Д-III, то результат генотипування буде відповідати максимальному показникові Д-III з ДНК-профілями, що мають амплікони розміром 520 п.н. і більше. Генотипування епітелію слизової оболонки шлунка пацієнтів хворих на виразково-інфільтративний рак шлунка виявило досить стабільні ДНК-профілі розміром від 520 до 620 п.н. в усіх спостереженнях і мали повну відмінність від профілю маркеру норми (рис.1. №5, №6), тобто можна вважати, що вони відповідають ДНК-профілям пухлини.

За результатами генотипування ДНК-профілі слизової оболонки шлунка хворих на хронічну виразку шлунка мають перехідні форми від Д-II до Д-III. Серед ДНК-профілів епітелію СОШ Д-III переважали амплікони розміром 520 п.н. та 620 п.н. із значною генетичною відмінністю від інших груп. Можна вважати, що ДНК-профілі за результатами проведення типування методом ISSR-PCR які мають амплікони в межах від 520 до 620 п.н. відповідають вже наявності пухлини. Тобто у випадках коли при гістологічному виявленні Д-III, паралельно проведене ДНК-типсування дає показники профілів від 520 і до 620 п.н., то це свідчить про наявність пухлини. Із сказаного виходить висновок, що за допомогою методу ISSR-PCR ми можемо проводити ранню діагностику пухлинного росту.

#### **Висновки**

1. Дисплазія епітелію слизової оболонки шлунка за фенотипічними ознаками при хронічній виразці шлунка, хронічній виразці дванадцятипалої кишки і виразково-інфільтративним раком шлунка мають схожий вигляд, але за результатами генотипування епітелію слизової оболонки шлунка за реакцією ISSR-PCR пацієнтів з хронічною виразкою дванадцятипалої кишки, хронічною виразкою шлунка і виразково-інфільтративним раком шлунка виявлено, що характерні для Д зміни при них знаходяться в відповідній залежності з їхніми ДНК-профілями. Амплікаційний ДНК-профіль норми має спектр ампліконів розміром в межах 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 має два варіанти амплікаційних ДНК-профілів зі спектром ампліконів розміром 300 – 100 п.н.(I - варіант) та 500 – 100п.н.(II – другий варіант), дисплазія Д-III при хронічній виразці дванадцятипалої кишки має один варіант амплікаційного ДНК-профілю зі спектром ампліконів розміром 520 – 320 п.н., дисплазія Д-III при хронічній виразці шлунка має два варіанти амплікаційних ДНК-профілів розміром 600 – 320 п.н.(I - варіант) та 620 – 440 п.н.(II – варіант).
2. Результати генотипування епітелію слизової оболонки шлунка пацієнтів хворих на виразково-інфільтративний рак шлунка виявило досить стабільні ДНК-профілі, які представлені експансією фрагментів розміром 520 та 620 п.н. в усіх спостереженнях, що показало значну відмінність від таких при хронічній виразці шлунка та хронічній виразці дванадцятипалої кишки.

*Перспективи подальших досліджень.* В подальшому маркер планується дослідити на практиці з метою діагностики неопластичних змін епітелію слизової оболонки шлунка у хворих на хронічний атрофічний гастрит в різних його проявах.

#### **Список літератури**

1. Аруин Л. И. Новая Международная классификация дисплазий слизистой оболочки желудка / Л. И. Аруин // Росс. журн. гастроэнтерол., гепатол., колонопроктол. – 2002. - №3. – С.15 – 17.
2. 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.
3. Заридзе Д. Г. Канцерогенез / 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 – 18.
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.

#### **Реферати**

##### **СРАВНИТЕЛЬНАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РЕЗУЛЬТАТОВ ГЕНОТИПИРОВАНИЯ ЭПИТЕЛИЯ СЛИЗИСТОЙ ОБОЛОЧКИ ЖЕЛУДКА**

**Харченко А.В.**

Проведена сравнительная характеристика диагностика слизистой оболочки желудка, при помощи реакции ISSR-PCR, у пациентов, которые болеют хронической язвой двенадцатиперстной кишки, желудка и язвенно-инфильтративным раком желудка. Исследования показали изменения ДНК слизистой оболочки желудка характерные для этих нозологических групп. В случаях с дисплазиями разной степени выраженности произошли изменения в виде увеличения

##### **COMPARISON OF RESULTS OF THE GENOTYPING OF THE GASTRIC MUCOSA EPITHELIUM**

**Kharchenko A. V.**

Diagnostics of gastric mucosa, made by PCR-ISSR reaction, has been compared in patients, suffering from chronic duodenal ulcer, gastric ulcer and ulcero-infiltrative gastric cancer. Studies have shown the DNA changes of gastric mucosa, specific to these nosological groups. In cases with dysplasia of varying degrees of manifestation, changes were made in the form of

размеров ампликонов. Описанные изменения имеют характер микросателлитных экспансий. По результатам генотипирования эпителия слизистой оболочки желудка, пациентов с хронической язвой двенадцатиперстной кишки, желудка и язвенно-инфильтративным раком желудка обнаружено, что характерные для дисплазии изменения при них находятся в соответственной зависимости с их ДНК-профилями. Амплификационный ДНК-профиль нормы имеет спектр ампликонов размером в пределах 190 – 60 п.н нуклеотидов, дисплазия (D-I) слабо выраженная имеет амплификационный ДНК-профиль со спектром ампликонов размером от 220 до 60 п.н., дисплазия (D-II) умеренно выраженная имеет два варианта амплификационных ДНК-профилей со спектром ампликонов размером 300 – 100 п.н. (I - вариант) и 500 – 100 п.н. (II - вариант), дисплазия D-III при хронической язве двенадцатиперстной кишки имеет один вариант амплификационного ДНК-профиля со спектром ампликонов размером 520 – 320 п.н., дисплазия D-III при хронической язве желудка имеет два варианта амплификационных ДНК-профилей размером 600 – 320 п.н. (I - вариант) и 620 – 440 п.н. (II - вариант).

**Ключевые слова:** ДНК, ампликоны, фенотип.

Стаття надійшла 14.02.2014 р.

amplicones' upsizing. The described changes are of the microsatellite expansions type. The results of genotyping of gastric mucosa epithelium, patients with chronic duodenal ulcer, gastric ulcer and ulcero-infiltrative gastric cancer, found that changes, specific to dysplasia, and their DNA-profiles are interdependent. Normal amplified DNA-profile contains spectrum of amplicones measured within 190 – 60 p.n. (pairs of nucleotides); DNA-profile in low-grade dysplasia (D-I) contains spectrum of amplicones measured from 220 to 60 p.n.; medium-grade dysplasia (D-II) has two variants of amplified DNA-profiles with spectrums of amplicones measured 300 – 100 p.n. (I Variant) and 500 – 100 p.n. (II Variant); D-III dysplasia in chronic duodenal ulcer has single variant of amplified DNA-profile with spectrum of amplicones measured 520 - 320 p.n., D-III dysplasia in gastric ulcer has two variants of amplified DNA-profiles measured 600 – 320 p.n. (I Variant) and 620 – 440 p.n. (II Variant).

**Key words:** DNA, amplicones, phenotype.

Рецензент Гасюк А.П.

УДК 616-001.17:599.323.4:591.22:576.36

Ю. Б. Чайковский, О. И. Макарова, И. А. Черешнюк, Д. А. Лысенко  
 Национальный медицинский университет им. А. А. Богомольца, г. Киев,  
 Винницкий национальный медицинский университет им. Н.И. Пирогова, г. Винница

### СРАВНИТЕЛЬНАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА КЛЕТОЧНОГО ЦИКЛА И ФРАГМЕНТАЦИИ ДНК КЛЕТОК ЛЕГКИХ КРЫС ПОСЛЕ ОЖГОВОЙ ТРАВМЫ КОЖИ

В статье представлены результаты исследования показателей кинетики клеточного цикла клеток легких крыс через 14, 21 и 30 суток после термического повреждения кожи и применения в первые 7 суток после ожога 0,9 % раствора NaCl. Через 14 суток после термической травмы кожи наблюдалось меньшее количество клеток находящихся в фазе G0G1 ( $p < 0,05$ ) и определялись большие значения показателей фазы синтеза ядерной ДНК (S-фаза) ( $p < 0,05$ ), фрагментации ДНК (интервал SUB-G0G1) ( $p < 0,01$ ), индекса пролиферации и блока пролиферации ( $p < 0,05$ ) относительно аналогичных показателей у животных контрольной группы. Через 21 сутки после ожога кожи продолжают оставаться увеличенными значения показателей S-фазы ( $p < 0,05$ ), интервала SUB-G0G1 ( $p < 0,05$ ) и блока пролиферации ( $p < 0,05$ ) относительно аналогичных показателей у животных без ожогового повреждения. Также установлено, что через 30 суток после ожоговой травмы кожи значения интервала SUB-G0G1 были меньшими по сравнению с этим же показателем у животных через 14 суток после ожога ( $p < 0,05$ ). Через 30 суток после ожога кожи достоверных отличий между показателями клеточного цикла клеток легких животных с ожоговой травмой и контрольной группой не выявлено, однако, остаются увеличенными значения показателей интервала SUB-G0G1 ( $p < 0,01$ ).

**Ключевые слова:** легкие, клеточный цикл, ожог, проточная ДНК-цитометрия, крыса.

*Работа является фрагментом НДР «Структурные изменения в лёгких в условиях эндогенной интоксикации вызванной ожогом кожи и её коррекции отечественными инфузионными препаратами лактопротеином с сорбитолом и HAES-LX-5% (экспериментальное исследование)», номер госрегистрации: 0112U004187.*

Поражение легких является важнейшим элементом патогенеза ожоговой болезни и может быть первичным, в результате прямого термического поражения легких, и вторичным – в результате общего нарушения клеточной регуляции [1]. Вторичные послеожоговые пневмонии возникают без прямого термического поражения легких, развиваются во вторичном периоде, проявляются болями в грудной клетке, одышкой, кашлем с мокротой и повышением температуры тела [2]. По данным литературы пневмонии развиваются у 35-40 % больных, а при глубоких обширных ожогах наблюдаются у 80-90 % обожженных [4]. Причиной развития пневмоний чаще всего является аутоинфекция, а механизмы ее возникновения: аспирационный, ателектатический, гипостатический и септическо-эмболический [2]. Пневмонии могут осложняться абсцессами, экссудативными плевритами и др. На фоне ожогового поражения наблюдаются тромбозы и геморрагии в легких, а в период токсемии и ожоговой инфекции - эмболии и нагноения, а дыхательная недостаточность ведет к гипоксии жизненно важных органов [2]. На рентгенограммах органов грудной полости при ожогах отмечалось усиление легочного рисунка у 40 % обследованных. На 3 сутки при рентгенологическом обследовании у 56 % пациентов были выявлены инфильтративные изменения в легочной ткани [3]. Другими исследователями установлено, что через 7 – 10 суток после ожога в 68 % случаях имелись рентгенологические изменения в виде усиления сосудистого рисунка, инфильтративных изменений поэтому существует мнение о том, что поражение легких может развиваться и через 2 – 3 недели после термического ожога [4].