

showed that the endomorphy somatotype is a predictor of patients resistance to standard therapy. For 24 weeks of treatment among endomorph responders at the ACR20 were 32,5% and ACR50-5%, while among patients with balanced somatotypes these were respectively 2 and 5 time more. The research aim is to evaluate the effectiveness of standard treatment of patients in RA depending in their somatotypical status.

Key words: somatotype, somatotypical status, body composition, rheumatoid arthritis, healthy individuals.

Стаття надійшла до редакції 03.12.2013 р.

Стигар Мирослава Вікторівна - аспірант кафедри внутрішньої медицини №1 Вінницького національного медичного університету імені М.І.Пирогова; 79@ukr.net

Станіславчук Микола Адамович - д. мед. н., професор, завідувач кафедри внутрішньої медицини №1 Вінницького національного медичного університету імені М.І.Пирогова

© Харченко О.В.

УДК: 616.33 - 002 :616 - 002. 2:[611.018.7] : [616 - 052]

Харченко О.В.

Полтавський національний педагогічний університет імені В.Г.Короленка, кафедра медико-біологічних дисциплін (вул. Остроградського, 2, м.Полтава, 36003, Україна)

ДІАГНОСТИЧНІ ОСОБЛИВОСТІ ДИСПЛАСТИЧНИХ ЗМІН ЕПІТЕЛІЮ СЛИЗОВОЇ ОБОЛОНКИ ШЛУНКА ЗА ДОПОМОГОЮ МЕТОДУ ISSR-PCR У ХВОРИХ НА ХРОНІЧНУ ВИРАЗКУ ШЛУНКА

Резюме. Проведена діагностика за допомогою реакції ISSR-PCR, яка показала зміни ДНК епітелію слизової оболонки характерні для дисплазії епітелію різного ступеня тяжкості в слизовій оболонці шлунка у пацієнтів, які хворіють на хронічну виразку шлунка. У випадках із указаними дисплазіями відбулися зміни у вигляді збільшення розмірів ампліконів, які характерні для кожної з груп. Описані зміни мають характер мікросателітних експансій. Існує сильний кореляційний зв'язок між ступенем дисплазії, що виявлена за фенотипічними ознаками та показниками характерними для ДНК-типування епітелію слизової оболонки шлунка. Коефіцієнт кореляції Пірсона r_{xy} склав відповідно 0,960 та 0,951. Загальний результат свідчить про існування статистично достовірної залежності з ймовірністю 0,99.

Ключові слова: ДНК, амплікони, фенотип.

Вступ

Діагностика дисплазії епітелію слизової оболонки шлунка, як передракової зміни є актуальною. 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 різко підвищені [Серов и др., 1990; Аруин, 2002; Заридзе, 2004; Карселадзе, 2009].

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

PCR є універсальною технікою, але серед маркерів, основаних на її використанні, особливе місце займають ті, що є фрагментами, розташованими між локусами інвертних повторів ДНК: ISSR (Inter simple sequence repeats). Використання цих маркерів можливе завдяки тому, що геноми еукаріот у середньому на 30-90% представлені високо поліморфними повторюваними послідовностями. Повторювана ДНК виконує своєрідну функцію накопичення мутацій в геномі [Baldi, 2000].

Насиченість геномів мікросателітними послідовностями є результатом рівня стабільності мікросателітної ДНК. Інтенсивне подовження мікросателітних послідовностей за рахунок реплікаційних помилок має назву мікросателітної експансії [Mullis, Faloona, 1987; Freimer,

Slatkin, 1996]. Розподілення в геномі мікросателітів має особливий інтерес завдяки тій ролі, яку вони грають в розвитку онкологічних захворювань [Freimer, Slatkin, 1996; Wooster et al., 1999].

Метою нашого дослідження є виявлення диспластичних змін в слизовій оболонці шлунка у хворих на хронічну виразку шлунка за допомогою методу ISSR-PCR

Матеріали та методи

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" (Недержреєстрації 0110U002649).

В роботу покладено результати дослідження 50 спостережень слизової оболонки операційного матеріалу шлунків, що резеційовані з приводу хронічної виразки шлунка. Для дослідження брали зразки слизової оболонки шлунка з ознаками дисплазії різного ступеня, в якій вивчали зміни ДНК за допомогою полімеразної ланцюгової реакції (PCR) [Mullis, Faloona, 1987; Tsanev, 2005].

Індивідуальне ДНК-типування (генотипування) зразків слизової оболонки шлунка проводили шля-

Таблиця 1. Результати кореляційного аналізу між показниками дисплазії епітелію слизової оболонки шлунка за фенотипічними ознаками та показниками за результатами генотипування у хворих з хронічною виразкою шлунка.

	Ступінь дисплазії - ДНК-тип min	Ступінь дисплазії - ДНК-тип max
Коефіцієнт кореляції Пірсона r_{xy}	0,960	0,951
Тіснота зв'язку	дуже сильний	дуже сильний
Коефіцієнт детермінації $D=r_{xy}^2$	0,921	0,905
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	94,253	126,735
Загальний результат	статистично достовірна залежність з ймовірністю 0,99	статистично достовірна залежність з ймовірністю 0,99

хом ампліфікації ДНК в полімеразній ланцюговій реакції (PCR) з використанням ISSR - праймеру S2, який мав структуру: (AGC)₆G [Mullis, Faloona, 1987].

Ампліфікацію проводили в 25 мкл реакційної суміші, що містила 1x реакційний буфер з трифосфатами, праймер наведеної структури, Таг-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) "Терцик" ТП4-ПЦР 01 ("ДНК - технологія", Росія) в режимі: I - 95° - 2 хв., II - 94° - 30 с, 57° - 2 хв., 72° - 2 хв., III - 72° - 10 хв. Електрофоретичне розділення продуктів ампліфікації проводили в 2% горизонтальному агарозному гелі (Вагофор, Латвія) в 1 x TBE-буфері з наступним їх фарбуванням протягом 10 хв. у 0,5 мкг/мл розчині бромистого етидію і багаторазовою промивкою у проточній воді. Візуалізацію електрофореграм проводили на транслюмінаторі в ультрафіолетовому світлі з довжиною хвилі 365 нм з подальшим фотографуванням. Визначення розмірів ампліконів виконували за допомогою маркера молекулярної маси 1000 вр DNA-Ladder, pUC 19 DNA/ Msp I ("Fermentas", Литва) [Абрамов и др., 2006].

Результати. Обговорення

Генотипування епітелію слизової оболонки шлунка виявило різноманіття ампліфікаційних профілів зразків ДНК слизової оболонки шлунка. Але незважаючи на певне різноманіття зразків вдалося згрупувати ДНК-профілі відповідно до фенотипічних ознак і виділити ПЛР-типи (рис. 1).

ДНК-профілі, котрі відповідали за фенотипом дисплазіям різного ступеня:

- фенотип Д-I з ДНК-профілями розміром - 220, 210, 200, 190, 160, 120, 110, 90, 80, 70, 60 п.н.

- фенотип Д-II ДНК-профілів з варіантами розміром - 320, 300, 240, 220, 210, 200, 190, 180, 160, 140, 120 п.н. та 520, 500, 480, 460, 440, 420, 410, 400, 360,

300, 220 п.н.

- ДНК-профілі, що відповідали фенотипу Д-III були також двох варіантів: перший розміром - 620, 600, 580, 540, 520, 500, 480, 460, 420, 410, 340 п.н. і другий - 620, 610, 600, 580, 560, 540, 520, 500, 480, 460, 440 п.н.

Профілі маркера слизової оболонки шлунка в нормі містили фрагменти розміром 190, 180, 160, 140, 120, 110, 90, 70, 60 п.н. і були ідентичні в межах своєї групи, але суттєво відрізнялись від ДНК-профілів інших досліджених груп.

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

ДНК-профілі слизової оболонки шлунка Д-II містили два варіанти з присутністю ампліконів розміром 320 п.н. (перший варіант) та 520 п.н. (другий варіант) (рис. 2). Останні мали значну подібність на рівні 63,6% з першим варіантом ДНК-профілів слизової оболонки шлунка типу Д-III. Це свідчить, що ДНК-профілі Д-II змінюються і мають перехідні форми щодо ПЛР типу Д-III.

В ДНК-профілях СОШ Д-III переважали амплікони розміром від 520 п.н. до 620 п.н., вони мали значну генетичну відмінність від інших груп спостереження (рис. 3) і повністю відрізнялись від норми, але мали

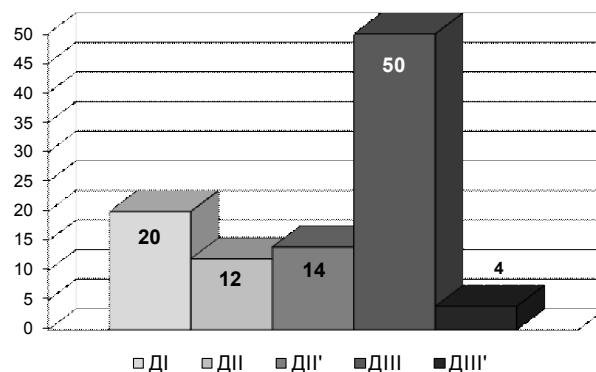


Рис. 1. Розподілення ДНК-профілів слизової оболонки шлунка у хворих з хронічною виразкою шлунка.

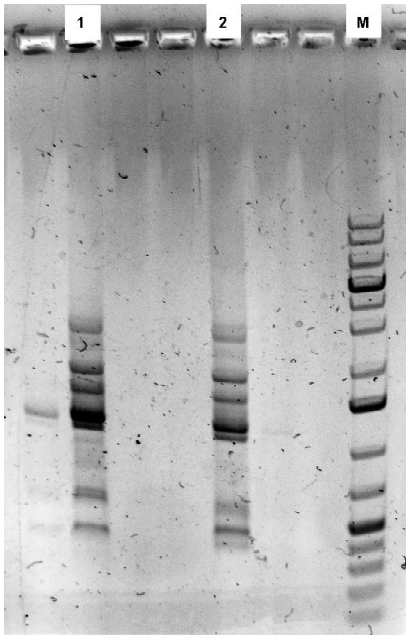


Рис. 2. Електрофореграми продуктів ампліфікату зразків ДНК слизової оболонки шлунка Д-II : 1 - перший варіант, 2 - другий варіант М - маркер розміру фрагментів ДНК.

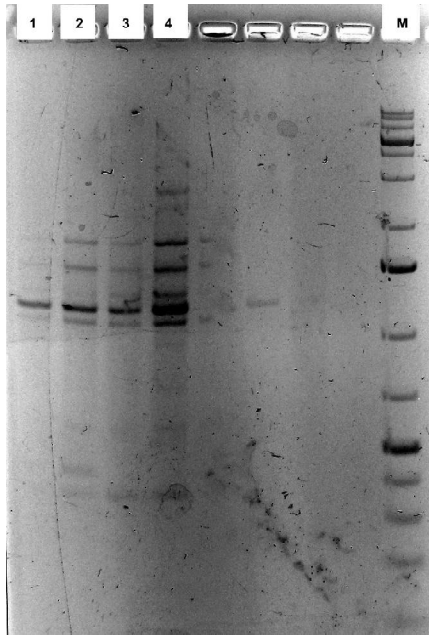


Рис. 3. Електрофореграми продуктів ампліфікату зразків ДНК слизової оболонки шлунка: 1 - ДНК-профіль Д-II перший варіант; 2 - ДНК-профіль Д-II другий варіант; 3 - ДНК-профіль Д-III перший варіант; 4 - ДНК-профіль Д-III другий варіант; М - маркер розміру фрагментів ДНК.

досить високий ступінь подібності (72,7%) в межах своєї групи.

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 слизової оболонки шлунка Д-III переважали амплікони розміром 520 п.н. та 620 п.н. із значною генетичною відмінністю від інших груп. ДНК-профілі за результатами проведення типування методом ISSR-PCR в кожному випадку виявляються за максимальним вираженням дисплазії.

Між ступенем дисплазії епітелію слизової оболонки шлунка за фенотипічними ознаками і показниками ДНК-типуювання зразків слизової оболонки шлунка коефіцієнт кореляції Пірсона r_{xy} складає відповідно 0,960 і 0,951, що означає дуже сильний і дуже сильний за тіснотою кореляційний зв'язок між показниками. Коефіцієнт детермінації $D=r_{xy}^2$ склав 0,921 і 0,905 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 відповідає $r_{xy} > r_{cr}$. Порівняння коефіцієнта кореляції r_{xy} з кри-

тичним (табличним) значенням r_{cr} для значущості 0,99 відповідає $r_{xy} > r_{cr}$. Коефіцієнт коваріації був 94,253 та 126,735 відповідно, що дає можливість зробити висновок статистично достовірної залежності між названими показниками з ймовірністю 0,99 (табл. 1).

Висновки та перспективи подальших розробок

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

Фенотип Д-II був неоднорідний і мав ДНК-профілі двох варіантів розміром: 320, 300, 240, 220, 210, 200, 190, 180, 160, 140, 120 п.н. та 520, 500, 480, 460, 440, 420, 410, 400, 360, 300, 220 п.н.

Фенотип Д-III мав також два варіанти ДНК-профілів: перший розміром - 620, 600, 580, 540, 520, 500, 480, 460, 420, 410, 340 п.н. і другий - 620, 610, 600, 580, 560, 540, 520, 500, 480, 460, 440 п.н., що свідчить про генетичну неоднорідність дисплазій слизової оболонки при ХВШ.

2. Між ступенем вираження дисплазії епітелію слизової оболонки за фенотипічними ознаками і показниками ДНК-типуювання зразків слизової оболонки шлунка за методом ISSR-PCR коефіцієнт кореляції Пірсона r_{xy} дорівнював відповідно 0,960 та 0,951, що дає можливість зробити висновок про існування дуже сильного за тіснотою зв'язку.

3. 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-типуювання епітелію слизової оболонки шлунка з фенотипами дисплазій епітелію і дозволяє виявити зміни, які в них відбуваються.

У подальшому маркер планується дослідити на практиці з метою діагностики неопластичних змін епітелію слизової оболонки шлунка у хворих з хронічними атрофічними гастритами.

Список літератури

Абрамов Д.Д. Точность метода полимеразной цепной реакции "в реальном времени" /Д.Д.Абрамов, Д.Ю.Тро-

фимов, Д.В.Рибиков //Прикл. биохимия и микробиология.- 2006.- Т.42.- С.485-488.

Аруин Л.И. Новая Международная классификация дисплазий слизистой оболочки желудка /Л.И.Аруин //

- Росс. журн. гастроэнтерол., гепатол., колонопроктол.- 2002.- №3.- С.15-17.
- Канцерогенез; под ред Д.Г.Заридзе.- Москва: Медицина, 2004.- 576с.
- Карселадзе А.И. Некоторые основополагающие понятия онкоморфологии в свете достижений современной молекулярной биологии /А.И.Карселадзе //Архив патол.- 2009.- Вып.5.- С.17-21.
- Серов В.В. Ранний рак желудка: морфология, гисто- и морфогенез /В.В.Серов, В.Б.Золотаревский, А.В.Берестова //Архив патол.- 1990.- №5.- С.70-74.
- 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.
- Freimer N.B. Microsatellites: evolution and mutational process /N.B.Freimer, M.Slatkin //Ciba Found Symp.- 1996.- №197.- P.51-67.
- 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.
- Tsanev R. Molecular mechanisms of cancer cells survival /R.Tsanev //J.BUON.- 2005.- №10.- P.309-318.
- 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.

Харченко А.В.

ДИАГНОСТИЧЕСКИЕ ОСОБЕННОСТИ ДИСПЛАСТИЧЕСКИХ ИЗМЕНЕНИЙ ЭПИТЕЛИЯ СЛИЗИСТОЙ ОБОЛОЧКИ ЖЕЛУДКА ПРИ ПОМОЩИ МЕТОДА ISSR-PCR У БОЛЬНЫХ С ХРОНИЧЕСКОЙ ЯЗВОЙ ЖЕЛУДКА

Резюме. Проводимая диагностика слизистой оболочки при помощи реакции ISSR-PCR у пациентов болеющих хронической язвой желудка, показала изменения ДНК характерные для дисплазии разной степени. 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 0,960 и 0,951. Общий результат свидетельствует о существовании статистически достоверной зависимости с вероятностью 0,99.

Ключевые слова: ДНК, ампликоны, фенотип.

Kharchenko A. V.

DIAGNOSTIC FEATURES OF DYSPLASTIC CHANGES OF GASTRIC MUCOSA EPITHELIUM DETECTED BY THE ISSR-PCR METHOD IN PATIENTS WITH CHRONIC GASTRIC ULCER

Summary. Diagnosing of mucosa, provided by the ISSR-PCR reaction, in the patients with the chronic gastric ulcer has shown DNA changes which are specific to the dysplasia of the different stages. In the cases of indicated dysplasia the changes were observed in the form of amplicones' enlargement, specific for each group. The indicated changes are characterized as microsatellite expansions. There is a strong correlation between the stage of dysplasia, identified on the phenotypical features and the indices, specific to DNA-typing of the gastric mucosa epithelium. Pearson correlation coefficient r_{xy} constituted 0.960 and 0.951, respectively. The total results founded the existences of the statistically significant dependence with 0.99 probability.

Key words: DNA, amplicones, phenotype.

Стаття надійшла до редакції 11.12.2013р.

Харченко Александр Викторович - к. мед. н., доцент, завідувач кафедри медико-біологічних дисциплін ПНПУ імені В.Г.Короленка; harchenko1957@rambler.ru

© Яремчук Л.В.

УДК: 618.2-07:618.146

Яремчук Л.В.

Вінницький національний медичний університет імені М.І. Пирогова (вул. Пирогова, 56, м.Вінниця, 21018, Україна)

МОЖЛИВОСТІ ТРАНСВАГІНАЛЬНОЇ ЕХОГРАФІЇ В ДІАГНОСТИЦІ ІСТМІКО-ЦЕРВІКАЛЬНОЇ НЕДОСТАТНОСТІ

Резюме. Робота присвячена діагностиці істміко-цервікальної недостатності шляхом трансвагінальної ехографії. Вивчено основні фактори ризику розвитку передчасних пологів. Розроблено бальну ехосонографічну оцінку спроможності шийки матки при вагітності, виділено чіткі ультразвукові критерії оцінки спроможності шийки матки при вагітності та визначено найбільш оптимальні прогностично-значимі терміни проведення трансвагінальної ехографії шийки матки у вагітних. Своєчасне проведення, правильна оцінка ультразвукової діагностики істміко-цервікальної недостатності та її раціональне лікування дозволяє зменшити випадки передчасних пологів та скоротити відсоток перинатальних втрат.

Ключові слова: істміко-цервікальна недостатність, ультразвукова цервікометрія, фактори ризику передчасних пологів.

Вступ

Проблема невиношування вагітності є однією з актуальних в сучасному акушерстві, так як призводить не тільки до порушення репродуктивної функції жінки, але й здійснює негативний вплив на народжуваність, обумовлюючи значне підвищення рівня перинаталь-

ної смертності і захворюваності новонароджених в ранньому неонатальному періоді [Сидельникова, 2005]. Не дивлячись на багатофакторність етіології невиношування, однією з головних причин, яка викликає переривання вагітності в другому триместрі, є істміко-