

УДК 618.145-006

В. Г. Дубініна, канд. мед. наук, доц.,

В. П. Доменюк, канд. біол. наук,

Т. Г. Вербицька, канд. біол. наук,

В. В. Бубнов, канд. мед. наук

ПОЛІМОРФІЗМ ПРОМОТОРІВ ЕСТРОГЕНОВИХ РЕЦЕПТОРІВ АЛЬФА І БЕТА ПРИ РАКУ ЕНДОМЕТРІЯ

Одеський державний медичний університет

Ядерні рецептори представлені великою сім'єю лігандзалежних транскрипційних факторів, включаючи стероїдні рецептори (SRs), тироїд-ретиноїдні рецептори (TR, RARs, RXRs), рецептори вітаміну D3 (VDR), естрогенові рецептори (ER-альфа і ER-бета) та орфанові рецептори, для яких ліганди ще не ідентифіковані. Усі ядерні рецептори мають гідрофобну зону, з якою специфічно зв'язуються ліганди [1]. Дослідження показали, що людина має 2 види естрогенових рецепторів: ER-альфа та ER-бета. Обидва вони зв'язують естрогени і мають різну локалізацію та концентрацію. Між двома видами рецепторів існують структурні розбіжності у лігандзв'язуючій зоні E і у ділянці A, що відповідає за зв'язування з активаційним комплексом AF1. Функціональні розбіжності проявляються в активації транскрипції генів-мішеней у присутності ER-альфа та інгібуванні їх експресії у присутності ER-бета [2].

Для ER-альфа гена ідентифіковано 10 промоторних зон, 3 промоторні зони — A, B і C

[3; 4] — найбільш вивчені. Дані промотори регулюють синтез специфічних транскриптів, які відповідають ER-альфа A, ER-альфа B, ER-альфа C ізоформам. Нині існує дуже мало досліджень щодо мутацій або інших структурних перебудов ER генів при раку ендометрія. Мутації в зоні промоторних регіонів часто спричинюють активацію або втрату функції цих генів. Оскільки розвиток неоплазії ендометрія найчастіше є естрогензалежним процесом, нами проаналізовані промоторні зони ER-альфа A, ER-альфа B, ER-альфа C та ER-бета для пошуку мутацій при раку ендометрія [5–8].

Мета роботи — вивчення поліморфізму промоторних регіонів генів рецепторів естрогенів.

Матеріали та методи дослідження

Тканину ендометрія отримано від 38 хворих гінекологічного відділення онкологічного центру Одеси. Гістологічні типи були такими: аденокарцинома ендометрія — 25, аденоматоз — 6, гіперплазія ендометрія — 5, поліп — 2.

За норму вважали ДНК, виділену з крові здорових пацієнтів, — 4.

Виділяли ДНК із зразків тканини за такою методикою.

До наважки тканини 100–150 мг або до клітин з 1 мл крові додавали 1 мл STE, 1/10 об'єму 10%-го розчину SDS, EDTA до концентрації 50 ммоль і протейназу K до кінцевої концентрації 50 мг/мл. Інкубували при +37 °C протягом ночі або довше — до перетравлення тканини. Потім охолоджували і додавали 1/10 об'єму 3 M розчину ацетату натрію та рівний об'єм хлороформу, м'яко екстрагували на гойдалці протягом 15–20 хв при 160 об/хв. Центрифугували 10 хв при 8000 об/хв. Верхню водну фазу обробляли хлороформом двічі. До водної фази додавали 2 об'єми 95%-го етанолу. Інкубували 1 год при –20 °C, потім центрифугували протягом 10 хв при 8000 об/хв. Осад ДНК промивали в 500 мкл 70%-го етанолу і висушували при кімнатній температурі. Осад розчиняли у 200 мкл буфера ТІ рН-7,6.

Кількість і якість виділених препаратів ДНК оцінювали

електрофорезом в агарозному гелі та спектрофотометрично. Реакцію ампліфікації проводили в об'ємі 25 мкл із праймерами до промоторів ізоформ ER-альфа А, ER-альфа В, ER-альфа С та ER-бета промотору за Sasaki [5].

За допомогою градієнтного блока для ПЛР були відпрацьовані умови відпалу та концентрація іонів Mg для досліджуваних праймерів. Температура відпалу 59 °С для ER-альфа А, ER-альфа С ізоформ та ER-бета, 57 °С — для ER-альфа В. Концентрація іонів Mg — 0,15 ммоль. Для введення флуоресцентної мітки IRD-800 до кожного праймера на 5'-кінець приєднували 18-мірний олігонуклеотид, що являв собою універсальний праймер фага M13-TGT AAA ACG ACG GCC AGT. У реакцію ампліфікації вводили універсальний праймер фага M13-TGT AAA ACG ACG GCC AGT, мічений IRD-800. Таким чином, здійснювалося так зване «хвостове» введення флуоресцентної мітки у праймери в ході реакції ампліфікації. Детекцію та локалізацію точок мутацій здійснювали із застосуванням набору BESS-T scan [Ericentre Technologies] [6]. Одержували PCR-продукти, ампліфікуючи з одним флуоресцентно міченим праймером у присутності суміші, що містить dUTP-нуклеотид. Потім ампліфікати обробляли сукупністю ферментів N-глікозилази й ендонуклеази IV. Статистично відбувався розрив ланцюга ДНК на кожному Т-нуклеотиді. Мічені фрагменти розділяли на секвенуючому поліакриламідному гелі з детекцією флуоресценції.

Результати дослідження та їх обговорення

Внаслідок ПЛР із вихідними праймерами було отримано амплікони промоторних зон ізоформ ER-альфа А — 120 п. о., ER-альфа В — 187 п. о., ER-альфа С — 119 п. о. та ER-

бета — 110 п. о. Скринінг промоторів генів ER-альфа В та ER-альфа С з BESS-T scan [6] у 38 хворих з аденокарциномною ендометрія, атиповою гіперплазією, аденоматозом, поліпами та у 4 здорових контрольних пацієнтів показав ідентичність нуклеотидного складу в усіх досліджених пацієнтів (рис. 1).

Під час пошуку мутацій у промоторних зонах ER-альфа А та ER-бета нами було виявлено одонуклеотидні делеції Т-основи, присутність додаткового фрагмента за рахунок

заміни Т на G у промоторах при раку ендометрія у чотирьох пацієнтів з атиповою гіперплазією. Найчастішим випадком мінливості виявилася делеція у положенні 81 амплікона ER-бета (56 % випадків). Додатково у промоторі ER-бета в одному випадку було виявлено делецію у 48 пар основ (рис. 2). У нормі таких змін не знайдено.

Естрогенові та прогестеронові рецептори наявні при ендометріальній гіперплазії та ендометріюїдній карциномі, особливо низькодиференційо-

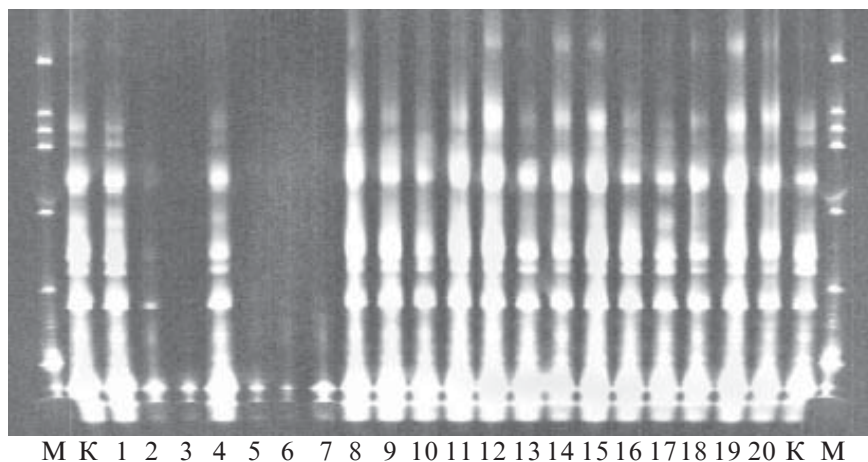


Рис. 1. Електрофореграма продуктів реакції секвенування промоторної зони гена рецептора естрогену ER-альфа: 1–20 — зразки ДНК хворих з аденокарциномною ендометрія; К — контрольні зразки ДНК здорових пацієнтів; М — маркер молекулярної ваги

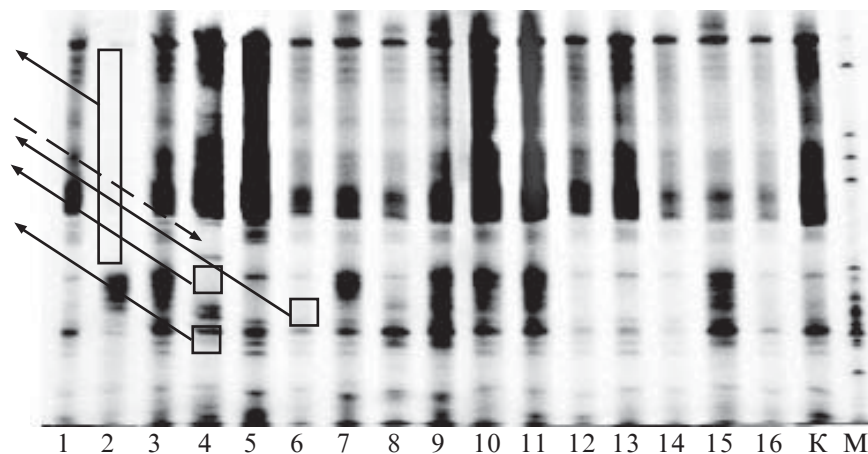


Рис. 2. Електрофореграма продуктів реакції секвенування промоторної зони гена рецептора естрогену ER-бета: 1–16 — зразки ДНК хворих з аденокарциномною ендометрія; К — контрольні зразки ДНК здорових пацієнтів; М — маркер молекулярної ваги

Стрілками позначено:
 □ — відсутність фрагмента;
 - - - — наявність додаткового фрагмента.

ваній [7]. Серозна карцинома та ендометріальна інтраепітеліальна карцинома звичайно негативні за експресією естрогенових рецепторів, виявлених імуногістохімічною технікою.

Як вже зазначалося вище, ідентифіковано 10 промоторних зон [1], три з яких — А, В та С — є найбільш вивченими і регулюють синтез специфічних транскриптів, які відповідають ER-альфа А, ER-альфа В, ER-альфа С ізоформам. Різні типи клітин і тканин мають різні ізоформи транскриптів естрогенових рецепторів. У молочній залозі детектовано найбільшу кількість ізоформ мРНК. В ендометрії преvalюють форми А та С; С-ізоформа преvalює також у яєчнику. Ступінь експресії у різних ізоформ неоднаковий. Специфічні шляхи ER-експресії забезпечують, наприклад, диференційовану дію естрогенів на тканину-мішень. Зміни у рівні експресії можуть бути епігенетичного походження (метилування), а також результатом генетичних перебудов. Однонуклеотидний поліморфізм (SNP) — найбільш загальний тип варіацій у геномі людини. Так, у роботі [9] продемонстровано генотипні розбіжності при карциномі й у нормі в кодоні 10 екзону 1 естрогенового рецептора альфа.

Оскільки підтипи естрогенових рецепторів альфа і бета різні за функцією й експресією, то величина їх співвідношення характеризує як певну тканину, так і її стан. Наприклад, бета-форма преvalює в нормальному яєчнику, а при карциномі яєчника 60 % зразків мають співвідношення альфа/бета більше одиниці [10]. При аденокарциномі ендометрія співвідношення альфа/бета зменшене порівняно з контролем — нормальним ендометрієм у постменопаузі — і становить 3,3 і 6,8 відповідно [11].

Поліморфізм у промоторній зоні рецепторів може порушувати їх експресію в той чи ін-

ший бік, змінюючи тим самим відповідь мішеней, і сприяти промоції пухлинного процесу. Одержані дані щодо виявлення поліморфізму і навіть делеції у промоторній зоні дозволяють зробити подібне припущення виключно лише при аденоматозі та раку ендометрія. Оскільки естрогеновому рецептору бета приписується протективна роль у функції естроген-рецепторного апарату, то, можливо, мутації у промоторі ERβ можуть нівелювати функцію цього гена.

Подальше дослідження варіантів поліморфізму у промоторі естрогенових рецепторів при аденоматозі й раку ендометрія в комплексі з їх вивченням дозволить виявити значення цих змін у розвитку пухлинного процесу.

Скринінг експресії генів естрогенових рецепторів і детекція мутацій у промоторній зоні ERα та ERβ, здійснювані для диференціювання хворих із різним статусом естрогенових рецепторів, дозволять вносити корективи у лікування пухлин ендометрія.

Висновки

Секвенування промоторного регіону ER-альфа А, В, С не виявило нуклеотидних змін у хворих із раком ендометрія, тимчасом як у промоторному регіоні ER-бета виявлені делеції поодиноких нуклеотидів, велика делеція розміром 48 пар основ, а також заміни нуклеотидів.

ЛІТЕРАТУРА

1. *Genomic organization of the human ER alpha gene promoter region* / M. Kos, G. Reid, S. Denger, F. Gannon // *Molecular Endocrinology*. — 2001. — Vol. 15. — P. 2057-2063.
2. *Pettersson K., Gustafsson C. Role of estrogen receptor beta in estrogen action* // *Ann. Rev. Physiol.* — 2001. — Vol. 63. — P. 165-192.
3. *Gustafsson J. Estrogen receptor — a new dimension in estrogen mecha-*

nism of action // *J. Endocrinol.* — 1999. — Vol. 163. — P. 379-383.

4. *Moras D., Gronemeyer H. The nuclear receptor ligand-binding domain: structure and function* // *Curr. Opin. Cell. Biol.* — Vol. 10. — P. 384-391.

5. *Cytosine phosphoguanine methylation of estrogen receptors in endometrial cancer* / M. Sasaki, L. Kotcherguina, A. Dharia et al. // *Cancer Research*. — 2001. — Vol. 61. — P. 32-62.

6. *Kangfu Y., Haffner M., Poysa V. Tailed primer base excision sequence scanning [TP-BESS] for detection of single nucleotide polymorphisms [SNPs]* // *Plant molecular biology reporter*. — 2001. — Vol. 19. — P. 49-54.

7. *Biochemical and immunogystochemical estrogen and progesterone receptors in adenomatous hyperplasia and endometrial carcinoma: correlation with stage and other clinicopathologic features* / H. Nyholm, A. Nielsen, J. Lyndrup et al. // *Am. J. Obstet. Gynecol.* — 1992. — Vol. 167. — P. 1334-1342.

8. *Sterman M. Theories of endometrial carcinogenesis: a multidisciplinary approach* // *USA and Canadian Academy of Pathology*. — 2000. — Vol. 13. — P. 295-308.

9. *Single nucleotide polymorphisms of estrogen receptor in human renal cell carcinoma* / Y. Tanaka, M. Sasaki, M. Kaneuchi et al. // *Biochim. and Biophys. Res. Com.* — 2002. — Vol. 296. — P. 1200-1206.

10. *Differential expression of estrogen receptor alpha and beta messenger RNA as potential marker of ovarian carcinogenesis* / P. Pujol, J. Rey, P. Nirde et al. // *Cancer Res.* — 1998. — Vol. 58. — P. 5367-5373.

11. *Well differentiated endometrial adenocarcinomas and poorly differentiated mixed mullerian tumors have altered ER and PR isoform expression* / A. Yazaeru, K. Nunes, M. Dalton et al. // *Oncogene*. — 2001. — Vol. 20. — P. 6965-6968.

ПОЛІМОРФІЗМ ПРОМОТОРІВ ЕСТРОГЕНОВИХ РЕЦЕПТОРІВ АЛЬФА І БЕТА ПРИ РАКУ ЕНДОМЕТРІЯ

З метою вивчення поліморфізму промоторних регіонів генів рецепторів естрогенів проаналізовано стан ДНК, виділеної з тканини ендометрія 38 хворих із патологією слизової оболонки матки. Показано, що скринінг експресії генів естрогенових рецепторів і детекція мутацій у промоторній зоні ER-альфа та ER-бета, здійснювані для диференціювання хворих із різним статусом естрогенових рецепторів, дозволяють вносити корективи у лікування пухлин ендометрія.

Ключові слова: рак ендометрія, рецептори естрогенів, промотори, поліморфізм.

ALFA AND BETA ESTROGEN RECEPTORS' PROMOTERS POLIMORPHISM AT ENDOMETRIAL CANCER

Analysis of DNA state that was received from endometrial tissue of 38 patients with the uterine mucosa pathology was carried out with the aim of polymorphism of promoter zones of the estrogen receptors genes study. It was shown that screening of estrogen receptors genes expression and the detection of mutations in a promoter zone ERa and ERb carrying out for the patients with various state of estrogen receptors differentiating will help to make the correctives in treatment of patients with the endometrial tumors.

Key words: endometrial cancer, estrogen receptors, promoters, polymorphism.

УДК 615.214:616.45-001.1/3

О. В. Кучеренко,

Я. В. Рожковський, *д-р мед. наук, проф.***ВПЛИВ ХРОНІЧНОГО СТРЕСУ НА ВІРУСІНДУКОВАНУ ПРОДУКЦІЮ ІНТЕРФЕРОНУ У ТВАРИН РІЗНОГО ВІКУ***Одеський державний медичний університет*

Не викликає сумнівів той факт, що захисні реакції організму в умовах тривалої дії стресових факторів, незважаючи на свою неспецифічність, мають індивідуальні особливості, характер яких значною мірою залежить від вікового стану тварин. Оскільки ж імунні реакції залишаються провідними в комплексі адаптивних механізмів, які забезпечують захист організму, вивчення вікових особливостей імунних зрушень на різних етапах формування стрес-синдрому могло б сприяти удосконаленню відомих і впровадженню нових, індивідуалізованих підходів до їх фармакологічної корекції [1; 3–5]. Найбільш суперечливими сьогодні залишаються дані щодо вікових особливостей впливу стресу на імунні реакції в умовах вірусного інфекційного процесу. Це пояснюється, по-перше, дією різних за силою і тривалістю стресових факторів, по-друге, специфікою репродукції конк-

ретного збудника вірусної інфекції, по-третє, віковими особливостями порушення конкретних механізмів протівірусної резистентності в умовах розвитку стрес-реакції [4–8]. Ці обставини були враховані в наших експериментах. Беручи до уваги, що одним із найпотужніших механізмів захисту організму від вірусної інфекції є його здатність відповідати продукцією інтерферону, **метою** нашої роботи стало вивчення особливостей інтерфероноутворення у різних за віком тварин після їх зараження вірусною інфекцією на різних стадіях хронічного стрес-синдрому.

Матеріали та методи дослідження

Дослідження проводили на статевозрілих (віком 4 міс) і старих (15 міс) мишах лінії СВА масою 18–20 г. Хронічний стрес у стадії виснаження відтворювали шляхом 4-добової депривації парадоксально-

го сну. Стан протівірусної резистентності організму оцінювали за вірусіндукованим інтерфероноутворенням, яке моделювали шляхом інтраназального зараження тварин сублетальною дозою патогенного штаму вірусу грипу А 3,5 Іg ЕІД₅₀ (0,2 мл). Відповідна доза вірусу грипу А була визначена серією попередніх дослідів із зараженням піддослідних тварин різними дозами збудника інфекції з наступною реєстрацією загибелі заражених мишей протягом 14 діб. Зараження кожної групи здійснювали після припинення експозиції стресу. α-Інтерферон у сироватці крові визначали через 2, 4 і 7 діб після інфікування шляхом титрування його протівірусної активності загальноприйнятним методом [2].

Результати дослідження та їх обговорення

Встановлено, що в сироватці крові статевозрілих інтактних мишей через 2 доби