

16. Nomura T. et al Unique mutations in the filaggrin gene in Japanese patients with ichthyosis vulgaris and atopic dermatitis // J Allergy Clin Immunol. – 2007. – Vol. 119. – P. 434–440.

ZUEVA M.I.¹, PARFYONOVA D.O.², ATRAMENTOVA L.A.²

¹ State Enterprise «Institute of Dermatology and Venereology of the National Academy of Medical Sciences in Ukraine»

Ukraine, 61022, Kharkov, Chernishevskaya str., 7/9

² V.N.Karazin Kharkov National University

Ukraine, 61022, Kharkov, Svoboda sq., 4, e-mail: atramentova@yandex.ru, gakkerell@gmail.com

SNP AND INSERTION-DELETION POLYMORPHISM OF THE FLG HUMAN GENE FOR SKIN DISEASES

Aims. Mutations in FLG-2282del4 and R501X associated with the third exon variously relate to skin diseases. **Methods.** The detection of mutations was performed by PCR-RFLP. **Results.** The FLG mutation frequency in the Slavic population of the Kharkov region is pR501X = 0,010, p2282del4 = 0,005. Inheritance of FLG 2282del4 deletion increases probability of atopic dermatitis and eczema by ten times. This deletion can be considered as a marker of the appropriate genetic predisposition and used in predictive medicine. The sensitivity is 13–23 % and the specificity is 99 %. Prognostic significance of a positive result is 86–92 %, of negative result is 70–73 %. **Conclusions.** FLG-2282del4 mutation increases the risk of allergic dermatitis and homozygous individuals are exposed to particularly severe course of the disease. Carrier testing this deletion is useful when predicting an individual's genetic predisposition to allergic.

Key words: FLG gene, 2282del4, R501X, skin diseases.

КАРПОВА І.С., ЛИЛО В.В., КОЦАРЕНКО К.В., РУБАН Т.П., МАЦЕВИЧ Л.Л. ЛУКАШ Л.Л.

Інститут молекулярної біології і генетики НАН України

Україна, 03680, м. Київ, вул. Заболотного, 150, e-mail: lukash@imbg.org.ua

ЛЕКТИН *PHASEOLUS VULGARIS* (РНА) ЯК ПОТЕНЦІЙНИЙ МОДУЛЯТОР ЗАХИСНИХ ТА РЕПАРАТИВНИХ ПРОЦЕСІВ В КЛІТИНІ

На сучасному етапі з'являється все більше свідчень, що онкологічним та іншим хворобам, асоційованим з мутаціями, можна значною мірою запобігти за допомогою речовин з протекторними та антимуtagenними властивостями або факторів (фармакологічних, дієтичних), здатних модулювати ефективність природних захисних та репаративних процесів [1]. Перспективними в цьому відношенні є лектини – мембраноактивні вуглеводзв'язувальні білки, притаманні всім живим системам, де відіграють фундаментальну роль в процесах вуглевод-білкового розпізнавання. Лектини вирізняються широким спектром біологічної дії, і у рослинних та тваринних організмів вони є компонентами захисних систем [2]. Лектинам притаманна структурно-функціональна гетерогенність. Це дозволяє висловити припущення, що ізоформи лектину, які

відрізняються за фізико-хімічними і біологічними характеристиками, можуть здійснювати регуляторну дію шляхом впливу на певні мішені різними (автономними або альтернативними) шляхами.

Раніше [3, 4, 5] для низки лектинів тваринного і рослинного походження було показано модулюючий ефект на експресію гена репаративного ензима Об-метилгуанін-ДНК метилтрансферази (MGMT). Від рівня активності цього протеїна залежить ефективність хіміотерапії онкологічних захворювань, що визначає актуальність пошуку речовин, здатних регулювати експресію гена MGMT.

Мета роботи полягала в оптимізації умов обробки клітин людини препаратами лектину РНА і його ізоформ для дослідження їх модулюючого впливу на експресію гена MGMT.

Матеріали і методи

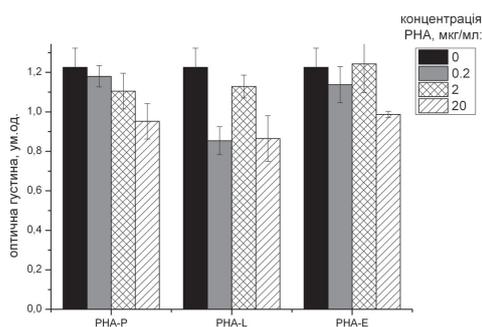
За об'єкт дослідження правили 2 лінії клітин: 4BL – лінія фібробластоподібних клітин, отриманих з периферійної крові здорового доно-

ра; Нер-2 – лінія клітин карциноми епітелію гортані. Клітини вирощували на стандартному ростовому середовищі ДМЕМ з додаванням 10 %

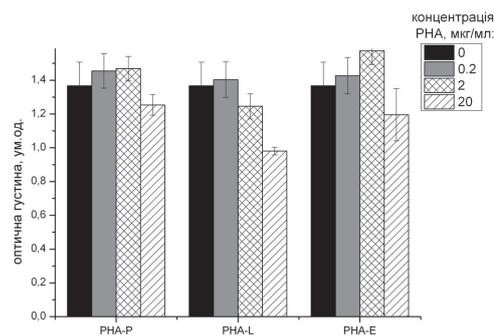
ембріональної сироватки і антибіотиків пеніциліну і стрептоміцину. Обробку клітин лектинами в різних концентраціях (0,02; 0,2; 2; 20 мкг/мл) проводили у безсироватковому середовищі протягом 24 год. Використовували комерційні препарати лектинів фірми «ЛЕКТИНОТЕСТ» (Львів, Україна): сумарний препарат РНА-Р (суміш ізоформ) та дві його основні гомотетрамерні ізоформи – лейкоцитарна (РНА-Л) і еритроцитарна (РНА-Е). Оцінку цитотоксичності препаратів проводили за допомогою мікрокультурального метаболічного МТТ-тесту при довжині хвилі 570 нм [6, 7]. Непрямим критерієм цитотоксичності є зміна метаболічної активності клітин за здатністю здійснювати редукцію тетразолієвої солі формазану. Для вивчення морфологічних особливостей клітин застосовували світлову мікроскопію з фарбуванням препаратів за Гімза–Романовським. Ідентифікацію експресії білка MGMT у клітинному екстракті проводили за допомогою Вестерн блот аналізу згідно [8]. Контроль рівномірності нанесення матеріалу здійснювали шляхом денситометрії гібридизаційної мембрани після її обробки барвником [9]. Для ідентифікації MGMT в клітинному екстракті застосовували моноклональні антитіла проти MGMT виробництва «Novus Biologicals, Littleton, Co» (США). Як вторинні, застосовували видоспецифічні антитіла, кон'юговані з пероксидазою хрому («Jackson ImmunoResearch», США). Всі процедури проводили згідно методичних вказівок фірми-виробника.

Результати та обговорення

За результатами МТТ аналізу всі культури клітин після обробки лектинами в найбільшій із застосованих концентрацій (20 мкг/мл) виявили тенденцію до зниження кількості метаболічно активних клітин в межах від 10 до 30 % в такому порядку: РНА-Л > РНА-Р ≈ РНА-Е (рис. 1, а, б).



а)



б)

Рис. 1. Оцінка цитотоксичності лектину *Ph. vulgaris* (РНА) та його ізоформ за допомогою МТТ-тесту на лініях клітин: а – 4BL; б – Her-2

Морфологічний аналіз препаратів клітин, оброблених лектинами, виявив зміни розмірів і форми клітин, утворення ними груп і конгломератів сферичної форми, наявність мікроядер, ядерець, вакуолей, ознак зміни проникності мембрани тощо (рис. 2, 3). Частота і спектр видимих змін залежали від клітинної лінії, типу і концентрації препарату. При цьому дія ізоформ мала певні відмінності. Вплив РНА-Л на клітини 4BL був більш вираженим і відрізнявся масовим формуванням ядерець (рис. 2, б), що може свідчити на користь посиленого синтезу білків. За дії ізоформи РНА-Е частіше утворювались агрегати і значно підвищувалась частота клітин з конденсованим ядром (каріопікноз) (рис. 2, д).

Руйнування ядерної і клітинної мембрани, характерні для останніх етапів апоптозу, особ-

ливо помітне в культурі ракових клітин Her-2 за дії препарату РНА-Л (рис. 2, г, 3, г). Однак, такі зміни морфологічних характеристик не спостерігались у випадку ізоформи РНА-Е (рис. 3, д).

Таким чином, ізоформи лектину *Ph. vulgaris* в діапазоні концентрацій 0,2–20 мкг/мл здатні по-різному впливати на морфологію клітин людини в культурі (лінії 4BL і Her-2) внаслідок втручання у метаболічні процеси. Відмінна реакція клітин на додавання різних препаратів лектинів дає підстави для подальшого порівняльного дослідження дії РНА і його ізоформ як потенційних модуляторів експресії гена MGMT. Для відпрацювання методики по індукції експресії білка MGMT за допомогою досліджуваних лектинів було обрано сумарний (інтегральний) препарат РНА-Р, який містить

всі п'ять ізоформ даного лектину в різних концентраціях (0,2; 2; 20 мкг/мл) та препарати окремих ізоформ РНА-L і РНА-E в найбільшій

концентрації – 20 мкг/мл. Об'єктом дослідження слугувала клітина лінія 4BL.

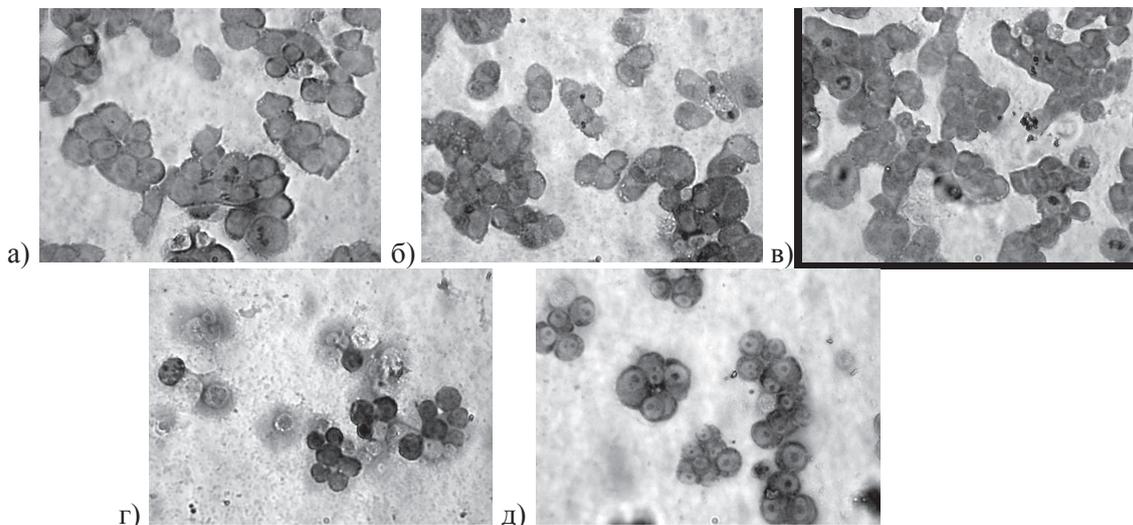


Рис. 2. Морфологія клітин 4BL: (а) – інтактна культура; (б) – обробка препаратом РНА-L (2 мкг/мл); (в) – обробка препаратом РНА-E (2 мкг/мл), (г) – обробка препаратом РНА-L (20 мкг/мл); (д) – обробка препаратом РНА-E (20 мкг/мл)

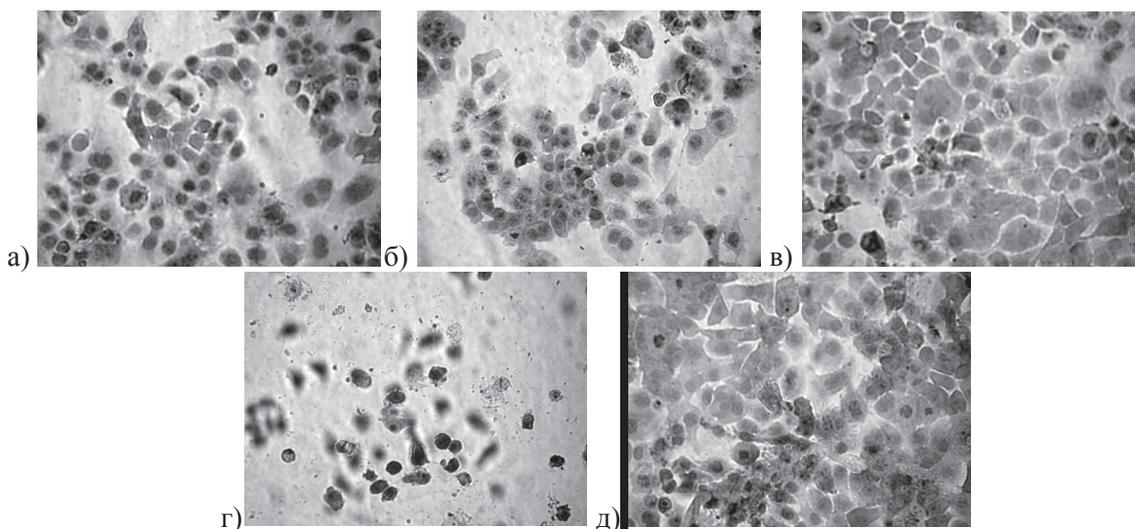


Рис. 3. Морфологія клітин Her-2: (а) – інтактна культура; (б) – обробка препаратом РНА-L (2 мкг/мл); (в) – обробка препаратом РНА-E (2 мкг/мл); (г) – обробка препаратом РНА-L (20 мкг/мл); (д) – обробка препаратом РНА-E (20 мкг/мл)

На рис. 4 представлено результати денситометричного аналізу сигналу при Вестерн блот гібридизації білкових екстрактів, одержаних з клітин людини в культурі (лінія 4BL), оброблених різними концентраціями РНА-Р, а також препаратами ізоформ РНА-L РНА-E в концентрації 20 мкг/мл. Контролем були клітини, які не контактували з лектинами.

Згідно даних, представлених на рис. 4, усі досліджені препарати лектинів виявили здатність впливати на рівень експресії білка з моле-

кулярною масою 48 кДа в клітинах лінії 4BL. Звичайну форму репаративного ензиму MGMT (24 кДа) в жодному варіанті досліджу, а також у контролі зареєстровано не було, що, як раніше було встановлено В.В. Лило із співавторами, є характерною ознакою даної лінії.

За найбільшої (20 мкг/мл) концентрації лектини виявили різноспрямований вплив на вихід продукту 48 кДа: для сумарного препарату РНА-Р рівень експресії білка порівняно з необробленим контролем знижувався (на 17 %), а у

випадку обох ізоформ – РНА-L і РНА-E спостерігалася стимуляція експресії (на 58 % та 63 %, відповідно).

Концентраційна залежність рівня експресії білка 48 кДа, одержана для препарату РНА-Р, мала нелінійний характер, де спостерігався пригнічуючий ефект більшої (20 мкг/мл) і стимулююча дія менших доз, серед яких найбільш ефективною виявилась концентрація 2,0 мкг/мл. Перевищення контрольного рівня білка, зареєс-

троване за допомогою Вестерн блот аналізу, складало 72 %.

Враховуючи, що біологічні ефекти лектинів опосередковуються сигнальними мережами, отримані результати є новим підходом до подальшого пошуку партнерів, які беруть участь у реалізації модулюючої дії вуглеводзв'язувальних білків на рівень експресії гена MGMT.

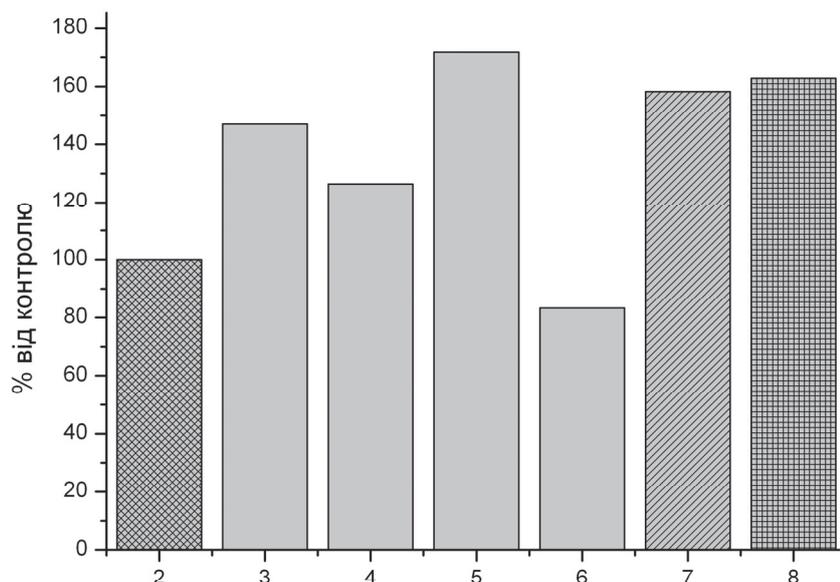


Рис. 4. Ідентифікація рівня експресії білка MGMT в культурі 4BL *in vitro*. Дані денситометрії сигналу (Вестерн блот аналіз) після обробки препаратами лектинів в різних концентраціях, мкг/мл. На гістограмах представлено результати денситометрії сигналів: 2 – контроль; 3 – РНА-Р (20,0); 4 – РНА-Р (2,0); 5 – РНА-Р (0,2); 6 – РНА-Р (0,02); 7 – РНА-L (20,0); 8 – РНА-E (20,0)

Висновки

Оптимізовано умови обробки клітин людини препаратами лектину РНА і його ізоформ. За концентрації (2 мкг/мл) проявилась різноспрямована дія ізоформ, де препарат РНА-L зменшував, а РНА-E збільшував кількість метаболічно активних клітин.

Показано ефект РНА і його ізоформ на

експресію модифікованої форми (48 кДа) репаративного ензиму MGMT.

Отримані дані дають підстави для подальших досліджень з метою розкриття шляхів і механізмів дії лектинів на спадкову мінливість і репарацію в клітинній системі захисту геному.

Література

1. Thun M.J., DeLancey J.O., Center M.M., Jemal A., Ward E.M. The global burden of cancer: priorities for prevention // *Carcinogenesis*. – 2010. – Vol. 61. – P. 100–110.
2. Лахтин В.М., Афанасьев С.С., Алешкин В.А., Несвижский Ю.В., Лахтин М.В., Шубин В.В., Черепанова Ю.В., Поспелова В.В. Классификация лектинов как универсальных регуляторных молекул биологических систем // *Вестник РАМН*. – 2009. №3. – С. 36–43.
3. Lylo V.V., Piven' O.O., Serebryakova K.V., Macewicz L.L., Lukash L.L. The influence of lectins on some repair processes in mammalian cells *in vitro* // *The Ukr. Biochem. Journal*. – 2008. – Vol. 80. – P. 60–65.
4. Gerson S.L., Trey J.E., Miller K. Potentiation of nitrosourea cytotoxicity in human leukemic cells by inactivation

- of O6-alkylguanine-DNA alkyltransferase // *Cancer Res.* – 1988. – Vol. 48. – P. 1521–1527.
5. Trey J.E., Gerson S.L.. The role of O6-alkylguanine-DNA alkyltransferase in limiting nitrosourea-induced sister chromatid exchanges in proliferating human lymphocytes // *Cancer Res.* – 1989. – Vol. 49. – P. 1899–1903.
 6. Twentyman P.R., Luscombe M.A. A study of some variables in a tetrazolium dye (MTT) based assay for cell growth and chemosensitivity. // *Br. J. Cancer.* – 1987. – Vol. 56. – P. 279–285.
 7. Фрешни Р.Ян. Культура животных клеток. Практическое руководство. – Москва: Бином. Лаборатория знаний, 2010. – 692 с.
 8. Лыло В.В., Мацевич Л.Л., Коцаренко Е.В., Бабенко Л.А., Корнелюк А.И., Сухорада Е.М., Лукаш Л.Л. Индукция экспрессии гена репаративного фермента O6-метилгуанин-ДНК метилтрансферазы под влиянием цитостатика ЕМАР II в клетках человека *in vitro* // *Цитология и генетика.* – 2011. – Т. 45. – С. 53–60.
 9. Aldridge G.M., Podrebarac D.M., Greenough W.T., Weiler I.J. The use of total protein stains as loading controls: an alternative to high-abundance single-protein controls in semi-quantitative immunoblotting. // *J. Neurosci. Methods.* – 2008. – Vol. 172. – P. 250–254.

KARPOVA I.S., LYLO V.V., KOTSARENKO K.V., RUBAN T.P., MATSEVYCH L.L., LUKASH L.L.

*Institute of Molecular Biology and Genetics of NAS of Ukraine
Ukraine, 03680, Kyiv, Zabolotnoho str., 150, e-mail: lukash@imbg.org.ua*

LECTIN OF *PHASEOLUS VULGARIS* (PHA) AS A POTENTIAL MODULATOR OF PROTECTIVE AND REPAIR PROCESSES IN CELL

Aims. Optimization of processing conditions of human cells with preparations of PHA and its isoforms to study their modulating effect on the *MGMT* gene expression. **Methods.** Object of study: standard (Hep-2 – laryngeal cancer) and obtained in our laboratory (4BL – cells derived from peripheral blood) human cell lines. Cytotoxicity was assessed with MTT assay at a wavelength of 570 nm. For light microscopy the preparations were stained according to Giemsa-Romanovsky. Identification of *MGMT* protein in cell extracts was performed by using Western blot analysis. For protein loading control there was used the densitometry control of the total amount of protein transferred to the membrane (Scion Image program). **Results.** According to the results of MTT analysis all lectin preparations at a concentration of 20 mkg/ml exhibited a weak cytotoxic effect. At a concentration of 2 mkg/ml isoforms demonstrated the opposite directed action. Morphological analysis revealed some of action features of every lectin product on the cell population. Western blot analysis showed that all studied lectin preparations affected the level of expression of the *MGMT* modified form (48 kDa) in the 4BL cell line. The concentration dependence (obtained for PHA-P) was of nonlinear character. At a larger concentration (20 mkg/ml) there was observed the inhibitory effect, which was replaced by a stimulating action of a lower dose (2 mkg/ml). **Conclusions.** Conditions of human cell treatment *in vitro* with PHA and its isoform preparations have been optimized. It was found that at the concentration 2 mkg/ml isoforms exhibit opposite directed effects: PHA-L decreases and PHA-E increases the amount of metabolically active cells. Both PHA and its isoforms were shown to modulate the expression of repair enzyme *MGMT* at the level of the modified (48 kDa) protein form. The data obtained serve as a starting point for further research of pathways and mechanisms of lectin action on DNA repair processes as a components of genome protection system.

Key words: lectin, PHA, isoforms, O6-methylguanine-DNA methyltransferase, cell viability.

КОМИССАРОВА С.М.¹, ЧАКОВА Н.Н.², КРУПНОВА Э.В.², МИХАЛЕНКО Е.П.², ЧЕБОТАРЕВА Н.В.², НИЯЗОВА С.С.²

¹ *Республиканский научно-практический центр «Кардиология»*

² *Институт генетики и цитологии НАН Беларуси*

Беларусь, 220036, г. Минск, ул. Р. Люксембург, 110, e-mail: kom_svet@mail.ru

ИНДИВИДУАЛИЗАЦИИ ЛЕЧЕНИЯ БЛОКАТОРАМИ РЕЦЕПТОРОВ АНГИОТЕНЗИНА II БОЛЬНЫХ ГИПЕРТРОФИЧЕСКОЙ КАРДИОМИОПАТИЕЙ

В настоящее время лечение больных ГКМП носит в основном симптоматический характер. Классическая терапия в-

адrenoблокаторами хоть и вызывает клиническое улучшение, но не улучшает прогноз и по данным функциональных методов исследования