

Вплив ліофілизованого лактоферину на культуру клітин Arn8 в нормальних умовах та після ультрафіолетового опромінювання

К.С. ГАЛЬЧЕНКО

Інститут проблем кріобіології і кріомедицини НАН України, м. Харків

Effect of Lyophilized Lactoferrin on Cell culture Arn8 in Normal Conditions and after Ultraviolet Irradiation

GALCHENKO K.S.

Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine of the National Academy of Sciences of the Ukraine, Kharkov

Проведено дослідження впливу лактоферину (ЛФ) на культуру клітин Arn8 в нормальних умовах, а також після ультрафіолетового (УФ) опромінювання. Встановлено, що ЛФ не ініціював просування клітин з пошкодженою ДНК в цикл проліферації. Також була досліджена дія ЛФ з молозива корів та ЛФ людини на клітини Arn8 в порівняльному аспекті. Показано, що інкубація клітин з ЛФ з молозива корів приводила до більш значної втрати життєздатності клітин, ніж при інкубації з ЛФ людини.

Проведены исследования влияния лактоферрина (ЛФ) на культуру клеток Arn8 в нормальных условиях, также после ультрафиолетового (УФ) облучения. Установлено, что ЛФ не инициировал продвижения клеток с поврежденной ДНК в цикл пролиферации. Также исследовано действие ЛФ из молозива коров и ЛФ человека на клетки Arn8 в сравнительном аспекте. Показано, что инкубация клеток с ЛФ из молозива коров приводила к большей потере жизнеспособности, чем при инкубации с ЛФ человека.

The effect of lactoferrin (LF) on Arn8 cell culture in normal conditions and after ultraviolet (UV) irradiation has been studied. It was defined that LF did not initiate the progression of cells with damaged DNA into proliferation cycle. The effect of LF from bovine colostrum as well as human LF on Arn8 cells has been also studied. It was shown that incubation of cells with LF from bovine colostrum leads to much greater loss of cell viability than in cells incubated with human LF.

Спектр біологічної дії ЛФ дуже широкий. ЛФ впливає на обмін речовин, імунну відповідь, перебіг запальних процесів та ін. [1, 2, 6, 7]. Зокрема, численні дослідження показують, що ЛФ бере участь в регуляції проліферації клітин як *in vitro*, так і *in vivo* [1, 8, 13]. Крім регуляторної функції, також відзначалась і цитотоксична дія ЛФ на ракові клітини. В роботі [4] показаний інгібіторний вплив ЛФ на проліферацію клітин раку грудей МДА-МВ-231 та епітеліальних клітин ліній HBL-100, MCF-7 та HT-29. Напроти, на інших лініях клітин (епітеліальних клітинах лінії IEC-18 кишечника щурів, клітинах строми ендометрію) ЛФ проявляв стимулюючу активність на їх ріст [7, 13]. Одним з можливих механізмів дії ЛФ може бути його безпосередній вплив на ДНК клітин. З літератури відомо, що ЛФ здатний зв'язуватись з нуклеїновими кислотами. Відомо, що ЛФ може індукувати затримку росту клітин, модулюючи експресію циклінзалежних кіназ в фазі G1 [4].

Попередні дослідження свідчать, що після пошкодження ДНК УФ випромінюванням можлива або її репарація, або апоптоз клітини при значному пошкодженні генетичного матеріалу [5, 10]. Обидва механізми залежать від функціонування інтактного гену p53 [10]. Ген p53 кодує фосфонуклеопротеїн p53, який специфічно з'єднується з ДНК, може активува-

Lactoferrin (LF) has a wide spectrum of biological action. LF participates in metabolism, immune responses, inflammatory processes etc [1, 2, 6, 7]. In particular, a large number of investigations demonstrate that LF takes part in regulation of cell proliferation both *in vitro* and *in vivo* [1, 8, 13]. It was noted that in addition to regulatory function the LF had cytotoxic effect on cancer cells. In the paper [4] the authors showed the inhibitory effect of LF on proliferation of breast carcinoma cells MDA-MB-231 as well as of other epithelial cell lines such as HBL-100, MCF-7 and HT-29. On the contrary, LF has cell-growth stimulating activity on the rat intestinal epithelial cell line IEC-18 and human endometrial stroma cells [8, 13]. One of the proposed mechanisms of LF action is its direct effect on the cell DNA. Literature data show that LF is able to form bonds with nucleic acids. It was demonstrated that LF induced growth arrest by modulating the expression of cyclin-dependent kinases in G1 phase [4].

Previous investigations testify to the fact that UV radiation-induced DNA damage results in DNA reparation or cell apoptosis under extreme damage of genome [5, 10]. Both mechanisms depend on the intact p53 gene functioning [10]. The p53 gene encodes p53 phosphonucleoprotein which by specific binding to DNA activates transcription and regulates cell cycle by arresting cells in late G1 phase. The role of p53

ти транскрипцію та регулювати клітинний цикл, зупиняючи клітини в пізній фазі G1. Роль p53 була вивчена в клітинах нормальної шкіри мишей та людини, і визначені, щонайменше, дві його функції на клітинному рівні. По-перше, він діє як “захисник геному”, коли пошкодження ДНК активує синтез білка p53, що приводить до затримки клітинного циклу в фазі G1 [3]. Вважається, що зупинка клітинного циклу надає додатковий час для репарації ДНК. Інший шлях функціонування p53 – це його роль в апоптозі, коли він приводить до запрограмованої смерті клітини, знищуючи пошкоджені клітини і запобігаючи їх переродженню в ракові [10].

В зв'язку з цим, було цікаво вивчити дію ЛФ на клітини з непошкодженою ДНК, а також на процеси відновлення ДНК після пошкоджуючої дії УФ опромінювання.

В роботі була використана лінія клітин A375RGCneo (Arn8). Це моношарова культура клітин лінії A375 меланоми людини, трансформована шляхом убудовування в ДНК p53-відповідаючого елементу, зчепленого з β -галактозидазним геном [5].

Клітини культивували в середовищі DMEM (Sigma-Aldrich) з додаванням 10% ембріональної сироватки теляти (FCS, Sigma), 1% пеніциліну/стрептоміцину (Sigma, 5 мг/мл), 2% L-глутаміну (Sigma, 200 мкмоль) у флаконах з площею дна 75 см² (Falcon) до рівня конфлюенції 70%. Після утворення моношару клітини пересівали у нові флакони в співвідношенні 1:10. Для відкріплення клітин використовували розчин, який містить 0,05% трипсину та 0,02% EDTA (Sigma). Перед експериментом по вивченню впливу ЛФ та УФ опромінювання на клітини Arn8, їх висівали в чашках Петрі діаметром 35 мм (Falcon), в кількості 5×10^4 клітин на чашку Петрі в 2 мл середовища та інкубували в CO₂-інкубаторі (37°C, 5% CO₂) протягом 24 год.

Життєздатність клітин визначали спектрофотометричним методом з використанням солі МТТ, яка в живих клітинах перетворюється на формазан. Розчин тетразоліної солі МТТ (3-[4,5-діметилтіазоль-2-іл]-2,5-дифеніл тетразолій бромід) (Sigma-Aldrich, 5 мг/мл) в фосфатному буфері (PBS) зберігався в темряві при кімнатній температурі протягом ночі. Розчин МТТ фільтрували для видалення нерозчинних залишків. Середовище культивування клітин заміняли на середовище культивування, що містило 10% (об/об) початкового розчину МТТ. Клітини інкубували 4 год при 37°C, після чого середовище заміняли на 1 мл діметилсульфоксиду (DMSO, Sigma) на кожну чашку Петрі. Зразки переносили в планшети з лунками, де їх автоматично розмішували для розчинення фіолетового продукту формазану, що утворювався

was studied in normal skin of mice and human and there are known at least two different pathways of p53 functioning on cellular level. First, it acts as the “guardian of the genome”, when DNA damage activates the synthesis of p53 protein, which leads to the mentioned above cell cycle arrest in G1 phase [3]. It is considered to give additional time for DNA repairing. Another way of p53 protein action results in apoptosis, when it leads to the programmed cell death. This removes damaged cells preventing them from getting cancerous [10].

In this connection it was interesting to study the effect of LF on the cells with intact DNA and also on the DNA repair processes after damaging effect of UV irradiation.

The cell line A375RGCneo (Arn8) was used in this work. This is the human melanoma cell line A375 which was transformed with p53-responsive element upstream of the β -galactosidase gene [5].

The cells were cultured in DMEM (Sigma-Aldrich) with 10% fetal calf serum (FCS, Sigma), 1% penicillin/streptomycin (Sigma, 5 mg/ml), 2 % L-glutamine (Sigma, 200 mM) in 75 cm² flasks until 70% confluency. Splitting of cells was done in 1:10 dilution. The solution containing 0.05% trypsin and 0.02% EDTA (Sigma) was used for splitting the cells.

Before the experiments on the effect of LF and UV irradiation on Arn8 cells, they were grown for 24 h in 35 mm Petri dishes (Falcon) at the density of 5×10^4 cells in 2 ml complete medium in the CO₂-incubator (37°C, 5% CO₂).

Cell viability has been determined with spectrophotometric method using MTT salt which turns into formazan product in living cells. A stock solution of the tetrazolium salt MTT (3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyltetrazolium bromide) (Sigma-Aldrich, 5mg/ml) in phosphate buffered saline was stored at room temperature in the dark overnight. MTT solution was filtered to remove any insoluble residues. Treatment medium was replaced by the medium containing 10% (v/v) MTT stock solution. Cells were incubated for 4 hrs at 37°C, then the medium was replaced by 1 ml dimethyl sulphoxide (DMSO, Sigma). The samples were placed into plates and were automatically shaken to dissolve the purple coloured formazan product which appears in cells, and the absorption of each well was measured at 570 nm on a Thermomax microplate reader against blank well containing DMSO [12].

Cells with damaged DNA have been detected by their blue coloration which appears after the incubation with chromogenic substrate X-Gal (5-bromo-4-chloro-3-indolyl β -D-galactopyranoside, Sigma). This substrate is cleaved by β -galactosidase to a blue product which stays within the cell. β -galactosidase synthesis is activated in cells by p53 protein, which in its turn, is

в клітинах, та міряли оптичну щільність кожного зразка при 570 нм на автоматичному спектрофотометрі (Thermomax microplate reader) проти холостої проби ДМСО [12].

Клітини з пошкодженою ДНК визначали за їх синім забарвленням, яке виникало після інкубації з субстратом X-Gal (5-бромо-4-хлоро-3-індоліл β -D-галактопіранозид, Sigma). Цей субстрат розщеплюється β -галактозидазою з утворенням синього продукту, що залишається всередині клітини. Синтез β -галактозидази активується в клітинах білком p53, який, в свою чергу, синтезується у відповідь на пошкодження ДНК.

Клітини фіксували в 0,5% глютаральдегіді протягом 15 хв. Після цього вони відмивались 15 хв водним розчином детергенту (PBS pH 7,4, 0,01% дезоксіхолат натрію, 0,02% IGEPAL, Sigma), а потім інкубувались зі свіжоприготовленим розчином X-Gal (водний розчин детергенту з 5 мкмоль фериціаніду калію, 5 мкмоль фероціаніду калію, 1 мг/мл X-Gal) протягом ночі при 37°C. Клітини відмивали двічі дистильованою водою, потім профарбовували 5%-м гематоксиліном Майєра (Sigma) протягом 5 хв. Наприкінці клітини накривали покривним скельцем [5].

Підрахунок клітин в чашках Петрі проводили "сліпим" методом під світловим мікроскопом. Підрахунок проводили в 10 полях зору в кожній чашці Петрі. Підраховували відсоток загальної кількості клітин від контролю та відсоток "синіх клітин" від загальної кількості клітин.

В експериментах був використаний ліофілізований ЛФ з молозива корів (кЛФ) (Sigma) та рекомбінантний ЛФ людини (лЛФ) (з *Aspergillus niger*, Singenta Lab).

Для опромінення клітин використовували флуоресцентну лампу Philips TL 100W/12. В експериментах використовували УФ випромінювання з довжиною хвилі 280-315 нм (УФВ).

Клітини опромінювались УФВ протягом 1 хв 18 с, що еквівалентно дозі 10 мкДж/см², в 2 мл фосфатного буфера (PBS, INC Biomedicals Ltd., Thame, UK) в чашках Петрі без кришечок під лампою TL12. Потім фосфатний буфер замінювали на попередні середовища та інкубували клітини протягом 24 год при 37°C. Після чого визначали кількість "синіх клітин".

Статистичну обробку отриманих результатів проводили за методом Стьюдента-Фішера.

Відомо, що структури ЛФ з молозива корів та ЛФ людини подібні, але не ідентичні і достовірно не відомо, чи відрізняються вони за своєю біологічною дією [11]. В роботі ми дослідили вплив лЛФ і кЛФ на життєздатність меланомних клітин лінії Arn8 в культурі в порівняльному аспекті.

На рис.1 показано вплив лЛФ і кЛФ на

synthesized in response to DNA damage. The cells were fixed in 0.5 % glutaraldehyde for 15 min. Then they were washed for 15 min in the detergent wash solution (PBS pH 7.4, 2 mM MgCl₂, 0.01% sodium deoxycholate, 0.02% IGEPAL, Sigma), then stained by incubating with freshly prepared X-Gal solution (detergent wash solution with 5 mM potassium ferricyanide, 5 mM potassium ferrocyanide, 1 mg/ml X-Gal) overnight at 37°C. The reaction product was indicated by a strong blue coloration in the cytoplasm of the cells. The cells were washed twice with distilled water and then counterstained with 5% Mayer's haematoxylin (Sigma) for 5 min. Finally, cells were covered with a coverslip [5]. Cell counting was done in "blind" manner under light microscopy. Ten randomly selected fields of view were counted for each dish. The percentage of total number of cells from non-treated cells and "blue cells" from total number of cells for each dish has been calculated.

Lyophilized lactoferrin from bovine colostrum (bLF) (Sigma, mol.wg. approx. 90 kDa) and human recombinant lactoferrin (hLF) (from *Aspergillus niger*, Singenta Lab.) have been used.

To perform the irradiation of cells, a Philips TL 100W/12 fluorescent tube was used. The UV radiation with wavelengths 280-315 nm (UVB) was used in the experiments. The cells were submitted to 1 min 18 s of UVB irradiation equivalent to the dose of 10 mJ/cm² in 2 ml phosphate buffered saline (PBS, INC Biomedicals Ltd., Thame, UK) without the dish lids under TL12 lamp. The PBS then was replaced by previous medium and the cells were incubated for 24 hrs at 37°C. Afterwards the number of "blue cells" was calculated.

The obtained results were statistically processed with Student-Fisher's method.

It is known that the structures of LF derived from bovine colostrum and human LF are similar but they are not identical, thus, it is not clear if there are any differences in their biological action [11]. In our comparative study we have investigated the effect of hLF and bLF on the viability of cultured melanoma cell line Arn8.

The Fig.1 shows the effect of hLF and bLF on the Arn8 cell viability depending on LF concentrations during 24 hrs' incubation.

The presence of both hLF and bLF in incubation media leads to the decrease of cell viability in dose-dependent manner. The incubation of cells in the medium, containing bLF under 0.1 and 1% concentrations, leads to much greater loss of viability (approximately 80%) than in cells, incubated in medium with hLF under the same concentrations (10 and 20%, correspondingly). It testifies to the fact that bLF was more toxic for melanoma cells. The mechanisms of LF action are not known completely, so it is still unclear

життєздатність клітин Arn8 в залежності від концентрації ЛФ при їх інкубації протягом 24 год.

Як видно з рис. 1, присутність в середовищі інкубації як лЛФ, так і кЛФ приводить до зменшення життєздатності клітин, причому спостерігався невеликий дозозалежний ефект. Інкубація клітин в середовищі, що містило кЛФ в концентраціях 0,1 і 1%, приводило до значно більшої втрати життєздатності (приблизно 80%), ніж у клітин, що інкубувались з лЛФ в таких самих концентраціях (10 і 20% відповідно). Це вказує на те, що кЛФ був більш цитотоксичний по відношенню до меланомних клітин лінії Arn8, ніж лЛФ. Механізми дії ЛФ ще не вивчені повністю, тому залишається неясним, чи ЛФ діє безпосередньо на ДНК клітини, чи, можливо, він діє на їх зовнішні мембрани та зменшує їх здатність до адгезії. Тому буде доцільним провести додаткові дослідження в цьому напрямку.

ЛФ має здатність безпосередньо зв'язуватись з нуклеїновими кислотами, а отже впливати на процеси, пов'язані з пошкодженням і репарацією ДНК, транскрипцією генів і т. д., що підтверджується великою кількістю досліджень [4, 6].

Пошкодження ДНК може бути викликане багатьма факторами, в тому числі і УФ випромінюванням, інтенсивність якого в природних умовах в останній час збільшується. Це збільшення пов'язане з тим, що внаслідок техногенного впливу зменшується товщина озонового шару атмосфери, який затримує значну частину жорсткого УФ випромінювання. Тому ми дослідили вплив ЛФ на загальну кількість клітин Arn8 в культурі та на кількість клітин з пошкодженою ДНК після опромінювання УФВ. Загальна кількість клітин в експериментальних групах виражалась в відсотках від загальної кількості клітин контрольної групи. Підрахунок проводився через 24 год після опромінювання клітин УФВ в дозі 10 мкДж/см².

Встановлено (рис.2), що інкубація клітин Arn8 в середовищі, що містило лЛФ в концентрації 1 мг/мл, протягом 24 год не мало помітної дії на кількість клітин. Опромінювання клітин низькою дозою УФВ (10 мкДж/см²) викликало зменшення кількості клітин на 70%. Кількість опромінених клітин, які інкубувались з ЛФ в концентраціях 0,5 та 1 мг/мл, не відрізнялась від кількості опромінених клітин, що інкубувались без ЛФ.

Попередні дослідження свідчать, що клітини Arn8 більшою мірою чутливі до УФ опромінювання завдяки тому, що в них обидві алелі p53 є функціонуючими, в порівнянні з іншими клітинами, що мають мутації гену p53. Відомо, що p53-мутовані клітини більш стійкі до пошкоджень ДНК та апоптозу, індукованих УФ, ніж клітини без мутацій [9].

Доза 10 мкДж/см² УФВ була обрана, виходячи з

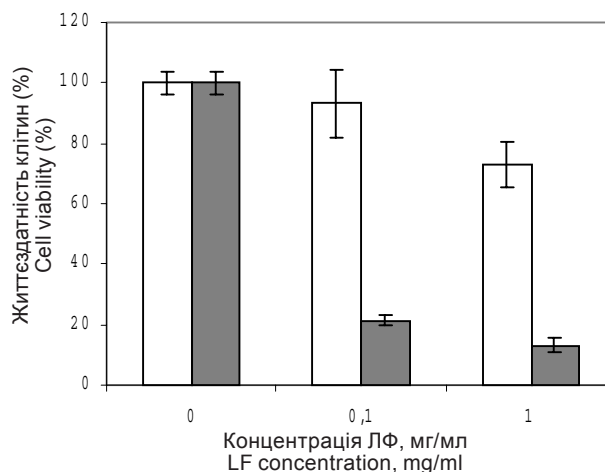


Рис. 1. Життєздатність клітин Arn8 в залежності від джерела і концентрації ЛФ: □ - лЛФ; ■ - кЛФ.

Fig.1. Arn8 cell viability depending on LF sources and concentrations. □ - hLF; ■ - bLF.

whether LF acts via binding to cell DNA or, perhaps, it interacts with cell outer membranes and diminishes their adhesive ability. Thus, further investigations in this direction should be done.

A number of studies confirms that LF can bind directly to nucleic acids and in this way affect the processes connected with damage and repair of DNA, gene transcription, etc [4, 6]. DNA damage may be caused by many factors, including UV radiation, intensity of which has increased recently in natural environment. This increase is connected with the fact that technogenic effect causes the depletion of the ozone layer responsible for the absorption of sufficient part of hard UV radiation.

Thus, we have studied the effect of LF on the total number of cultured Arn8 cells and on the number of cells with UV-irradiation damaged DNA. The total number of cells in experimental groups was expressed as a percentage of the total number of the control group. Cell counting was done 24 hrs after irradiation with UVB dose of 10 mJ/cm².

It was established (Fig.2) that incubation of Arn8 cells in the medium, containing hLF under concentration of 1 mg/ml for 24 hrs has no noticeable effect on cell number.

The exposure of Arn8 cells to low dose of UVB (10 mJ/cm²) causes the decrease of cell number for 70%. The number of irradiated cells incubated with LF in concentrations 0.5 mg/ml and 1 mg/ml did not differ from the number of UVB-irradiated cells without LF treatment. Previous observations show that Arn8 cell line is sensitive to UV radiation in a large measure due to the fact that both p53 alleles are functional in Arn8 cells in comparison with other cell lines that are known to bear p53 mutations. It is known that p53-mutated cells are more resistant to UV radiation-induced DNA damage and apoptosis than wild-type cells [9].

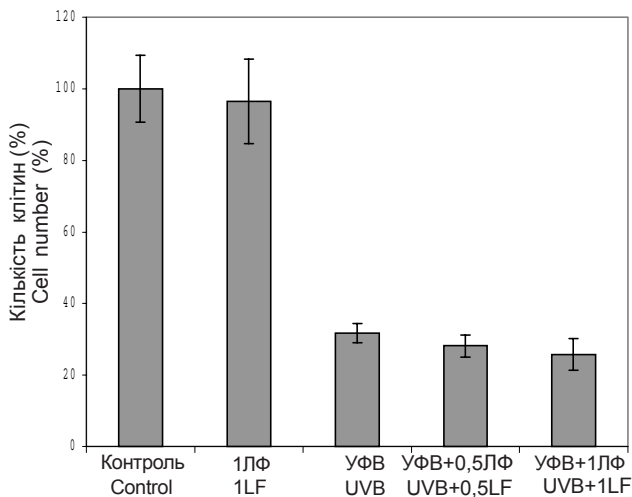


Рис. 2. Загальна кількість (%) клітин Arn8 після опромінювання УФВ в залежності від концентрації ЛФ. Контроль - інкубація клітин в середовищі без ЛФ і без опромінювання; 1ЛФ – інкубація клітин в середовищі з ЛФ (концентрація 1 мг/мл) без опромінювання; УФВ – клітини, опромінені УФВ; УФВ+0,5ЛФ – інкубація клітин в присутності ЛФ (концентрація 0,5 мг/мл) і опромінювання; УФВ+1ЛФ - інкубація клітин в присутності ЛФ (концентрація 1 мг/мл) і опромінювання.

Fig.2. Total Arn8 cell number after UVB irradiation depending on LF concentration.

Control – incubation of cells in the medium without LF, no irradiation; 1LF – incubation of cells in the medium containing LF under concentration of 1 mg/ml; UVB – UVB-irradiated cells; UVB+0.5LF – irradiated cells, incubated with the presence of LF under concentration of 0.5 mg/ml; UVB+1LF – irradiated cells, incubated with the presence of LF under concentration of 1 mg/ml.

даних роботи [5], де було показано, що саме така доза приводить до пошкодження ДНК в значній кількості клітин при досить високій кількості клітин, що залишаються життєздатними. Кількість “синіх клітин” (тобто клітин з пошкодженою ДНК) має пік приблизно на 24 год після опромінення. Це дозволяє вибрати час в 24 год для визначення р53-залежного синтезу β-галактозидази.

Відсоток клітин, що синтезують β-галактозидазу в клітинах Arn8 після УФВ опромінювання при описаних експериментальних умовах, представлений на рис. 3. Кількість “синіх клітин” в контрольній групі та після інкубації з ЛФ в концентрації 1 мг/мл не перевищувала 1-2%. При опромінюванні клітин УФВ в дозі 10 мкДж/см² кількість “синіх клітин” складала 20% через 24 год після опромінювання. Інкубація клітин з ЛФ в концентраціях 0,5 і 1 мг/мл не приводила до збільшення або зменшення кількості “синіх клітин” в групах, що опромінювались. Це свідчить, що ЛФ не змінює кількість клітин, зупинених в фазі G1, а, отже, не сприяє переходу клітин з пошкодженим геномом із фази G1 до S-фази та подальшій дуплікації пошкодженої ДНК.

Таким чином, не було відмічено прямого захисного ефекту ЛФ на життєздатність клітин Arn8 та

The dose of 10 mJ/cm² of UVB irradiation was chosen according to the paper data [5] as it was shown to cause DNA damage in large number of cells combined with adequate number of viable cells. The number of “blue cells” (i.e. cells with damaged DNA) has its peak at around 24 hrs after irradiation. It allows to choose the time of 24 hrs for the detection of p53-dependent β-galactosidase synthesis. The percentage of synthesis of β-galactosidase in Arn8 cell after the UVB irradiation under described experimental conditions is represented in Fig.3.

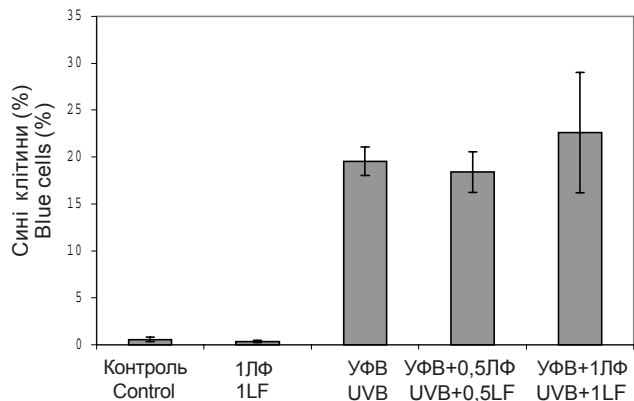


Рис. 3. Кількість “синіх клітин” (% від загальної кількості клітин) після УФВ опромінювання в залежності від концентрації ЛФ.

Контроль - інкубація клітин в середовищі без ЛФ і без опромінювання; 1ЛФ – інкубація клітин в середовищі з ЛФ (концентрація 1 мг/мл) без опромінювання; УФВ – клітини, опромінені УФВ; УФВ+0,5ЛФ – інкубація клітин в присутності ЛФ (концентрація 0,5 мг/мл) і опромінювання; УФВ+1ЛФ - інкубація клітин в присутності ЛФ (концентрація 1 мг/мл) і опромінювання.

Fig.3. “Blue cell” number (% from the total cell number) after UVB irradiation depending on LF concentration.

Control – incubation of cells in the medium without LF, no irradiation; 1LF – incubation of cells in the medium containing LF under concentration of 1 mg/ml; UVB – UVB-irradiated cells; UVB+0.5LF – irradiated cells, incubated with the presence of LF under concentration of 0.5 mg/ml; UVB+1LF – irradiated cells, incubated with the presence of LF under concentration of 1 mg/ml.

The number of “blue cells” in non-treated cells and cells incubated with LF under concentration of 1 mg/ml was about 1-2%. “Blue cells” number made 20% 24 hrs after the dose of 10 mJ/cm² of UVB. Incubation of cells with LF under concentrations 0.5 and 1 mg/ml did not lead to the increase or decrease of “blue cell” number in irradiated cells. This shows that LF does not change the number of cells arrested in G1 phase and, hence, does not promote the progression of cells with damaged genome from G1 to S-phase and further duplication of damaged DNA.

Thus, we conclude from our studies that LF has no protective effect on Arn8 cell viability under UV irradiation and UV radiation-induced genome damage. At the same time, “blue cell” number after UV radiation and incubation with LF under concentrations 0.5 and 1 mg/ml does not differ from the

захисту їх геномного матеріалу від пошкоджуючої дії УФ опромінювання. В той же час кількість “синіх клітин” після УФ опромінювання та інкубації клітин з ЛФ в концентраціях 0,5 та 1 мг/мл не відрізнялась від кількості “синіх клітин” після опромінювання та інкубації без ЛФ. Отже, ЛФ не ініціює просування клітин з пошкодженою ДНК до S-фази.

Виходячи з цього, буде цікавим в майбутньому дослідити вплив ЛФ на активність та повноту репарації пошкодженої ДНК.

Автор висловлює щирю подяку проф. Cristopher E.M. Griffiths, завідувачому Дерматологічним відділенням Hope Hospital, University of Manchester, за можливість виконання цієї роботи під час стажування. Також велика подяка док. Neil K. Gibbs за його допомогу у проведенні експериментальних досліджень в лабораторії Фотобіології.

Література

1. Белизи С., Назарова И.А., Климова И.А. Антиоксидантные свойства лактоферрина из женского молока // Бюлл. эксперим. биологии и медицины.– 1999.– N5.– С. 523-525.
2. Adamik B., Zimecki M., Waszczyk A. Lactoferrin effects on the in vitro immune response in critically ill patients // Arch. Immunol. Ther. Exp.– 1998.– Vol. 46, N3.– P. 169-176.
3. Blaydes J.P., Craig A.L., Wallace M. et al. Synergistic activation of p53-dependent transcription by two cooperating damage recognition pathways // Oncogene.– 2000.– Vol.19, N 34.– P. 3829-3839.
4. Damiens E., Yazidi I., Mazurier J. et al. Lactoferrin inhibits G1 cycline-dependent kinases during growth arrest of human breast carcinoma cells // J. Cell Biochem.– 1999.– Vol.74, N3.– P. 486-498.
5. Deck A., Blaydes J., Hupp T., Gibbs N.K. An ultraviolet action spectrum for p53 activation in vitro indicates that DNA may not be the primary chromophore // Br.J. Dermatol.– 1998.– Vol. 138.– P. 733.
6. Ellas E., Masson M., Mazurier J., Legrand D. Lactoferrin inhibits the lipopolysaccharide-induced expression and proteoglycan-binding ability of interleukin-8 in human endothelial cells // Infect. Immunol.– 2002.– Vol.70, N4.– P. 1860-1866.
7. Griffiths C., Cumberbatch M., Tucker S. et al. Exogenous topical lactoferrin inhibits allergen-induced Langerhans cell migration and cutaneous inflammation in humans // Br.J. Dermatol.– 2001.– Vol.144, N4.– P. 715-725.
8. Hagiwara T., Shinoda I., Fukuwatari Y, Shimamura S. Effects of lactoferrin and its peptides on proliferation of rat intestinal epithelial cell line, IEC-18, in the presence of epidermal growth factor // Biosci. Biotechnol. Biochem.– 1995.– Vol.59, N10.– P. 1875-1881.
9. Kim A.L., Athar M., Bickers D.R., Gautier J. Ultraviolet-B-induced G1 arrest is mediated by downregulation of cycline-dependent kinase 4 in transformed keratinocytes lacking functional p53 // J. Invest. Dermatol.– 2002.– Vol.118, N5.– P. 818-824.
10. Lane D.P. p53, guardian of the genome // Nature.– 1992.– Vol.358.– P. 15-16.
11. Moore S.A. Three dimensional structure of diferic bovine lactoferrin at 2.8 A resolution // J.Mol. Biol.– 1997.– Vol. 274.– P. 222-236.
12. Twentyman P.R., Luscombe M. 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.
13. Yanaihara A., Toma J., Saito H., Yanaihara T. Cell proliferation effect of lactoferrin in human endometrial stroma cells // Mol. Hum. Reprod.– 2000.– Vol.6, N 5.– P. 469-473.

Поступила 24.12.2002

number of blue cells after irradiation and incubation without LF. Thus, LF does not initiate the promotion of cells with damaged DNA into S-phase.

Basing on the data obtained it is of great interest to carry out further work on the effect of LF on the activity and completeness of DNA reparation.

I would like to thank Prof. Cristopher E.M. Griffiths (University of Manchester Dermatology Centre, Hope Hospital, UK) for offering me this training position in his laboratory.

I am also very grateful to Dr. Neil K. Gibbs for his great help during my work in Photobiology Unit.

References

1. Belizi S., Nazarova I.A., Klimova I.A. et al. Antioxidant properties of lactoferrin derived from woman milk // Bull. Experim. Biol. i Med.– 1999.– N5.– P. 523-525.
2. Adamik B., Zimecki M., Waszczyk A. Lactoferrin effects on the in vitro immune response in critically ill patients // Arch. Immunol. Ther. Exp.– 1998.– Vol. 46, N3.– P. 169-176.
3. Blaydes J.P., Craig A.L., Wallace M. et al. Synergistic activation of p53-dependent transcription by two cooperating damage recognition pathways // Oncogene.– 2000.– Vol.19, N 34.– P. 3829-3839.
4. Damiens E., Yazidi I., Mazurier J. et al. Lactoferrin inhibits G1 cycline-dependent kinases during growth arrest of human breast carcinoma cells // J. Cell Biochem.– 1999.– Vol.74, N3.– P. 486-498.
5. Deck A., Blaydes J., Hupp T., Gibbs N.K. An ultraviolet action spectrum for p53 activation in vitro indicates that DNA may not be the primary chromophore // Br.J. Dermatol.– 1998.– Vol. 138.– P. 733.
6. Ellas E., Masson M., Mazurier J., Legrand D. Lactoferrin inhibits the lipopolysaccharide-induced expression and proteoglycan-binding ability of interleukin-8 in human endothelial cells // Infect. Immunol.– 2002.– Vol.70, N4.– P. 1860-1866.
7. Griffiths C., Cumberbatch M., Tucker S. et al. Exogenous topical lactoferrin inhibits allergen-induced Langerhans cell migration and cutaneous inflammation in humans // Br.J. Dermatol.– 2001.– Vol.144, N4.– P. 715-725.
8. Hagiwara T., Shinoda I., Fukuwatari Y, Shimamura S. Effects of lactoferrin and its peptides on proliferation of rat intestinal epithelial cell line, IEC-18, in the presence of epidermal growth factor // Biosci. Biotechnol. Biochem.– 1995.– Vol.59, N 10.– P. 1875-1881.
9. Kim A.L., Athar M., Bickers D.R., Gautier J. Ultraviolet-B-induced G1 arrest is mediated by downregulation of cycline-dependent kinase 4 in transformed keratinocytes lacking functional p53 // J. Invest. Dermatol.– 2002.– Vol.118, N5.– P. 818-824.
10. Lane D.P. p53, guardian of the genome // Nature.– 1992.– Vol.358.– P. 15-16.
11. Moore S.A. Three dimensional structure of diferic bovine lactoferrin at 2.8 A resolution // J.Mol. Biol.– 1997.– Vol. 274.– P. 222-236.
12. Twentyman P.R., Luscombe M. 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.
13. Yanaihara A., Toma J., Saito H., Yanaihara T. Cell proliferation effect of lactoferrin in human endometrial stroma cells // Mol. Hum. Reprod.– 2000.– Vol.6, N 5.– P. 469-473.

Accepted in 24.12.2002