

**ЛИЛО В.В., КОЦАРЕНКО К.В., МАНЬКО В.Г., МАЦЕВИЧ Л.Л.,
РУБАН Т.А., ЛУКАШ Л.Л.**

*Інститут молекулярної біології і генетики НАН України,
Україна, 03143, вул. Заболотного, 150, e-mail: lukash@imb.org.ua*

ЦИТОКИНИ ЯК ПОТЕНЦІЙНІ МОДУЛЯТОРИ РЕПАРАЦІЇ ПЕРВИННИХ УШКОДЖЕНЬ, ІНДУКОВАНИХ АЛКІЛУВАЛЬНИМИ СПОЛУКАМИ

Забруднення довкілля є одним з основних факторів, що впливають на стабільність геному. Серед розмаїття антропогенних чинників, що здатні спричинити генотоксичну дію, можна виділити групу алкілувальних речовин. Вони є досить поширеними пошкоджуючими чинниками хімічної природи — в тому числі, як фактори промислового забруднення та професійного ризику.

Одним з генопротекторних механізмів, що протидіють мутагенному впливові алкілувальних сполук на клітинну ДНК, є репарація первинних пошкоджень, індукованих цими сполуками, що здійснюється, зокрема, репаративним ферментом O⁶-алкілгуанін-ДНК алкілтрансферазою (MGMT). Цей фермент реалізує пряму репарацію найбільш мутагенно- та канцерогеннонебезпечного пошкодження — O⁶-алкілгуаніну в клітинній ДНК [1, 2]. Таким чином, знижений рівень експресії та/або активності цього ферменту є важливим фактором ризику для людей, чия професійна діяльність передбачає контакт з алкіляторами. Тому важливо якомога краще зрозуміти механізми, що регулюють експресію цього ферменту.

Ці регуляторні механізми є складними і на сьогоднішній день недостатньо вивченими. Так, відомо, [3] що цей фермент є індукційним; його експресія може зростати у відповідь на ряд чинників (гіперметилування ДНК, розриви ДНК, тощо). Експресія MGMT може також регулюватися опосередкованим шляхом — через вплив регуляторних механізмів клітини (p53-опосередковані, протеїнкіназа С-опосередковані, фосфорилування, убіквітинування, тощо). Існують дані, що на експресію MGMT можуть впливати також цитокіни та фактори росту (інтерферон β , IL-3 — окремо чи в сполученні з SCF, а також GM-CSF) [4] — проте саме цей аспект проблеми вивчений недостатньо, і в літературі наявні лише поодинокі відомості, що стосуються цього питання. Наприклад, IFN- β знижує транскрипцію гену MGMT через індукцію експресії білка p53. Тому IFN- β може знижувати рівні MGMT в клітинах гліоми через інгібування транскрипції гену MGMT [5].

Цитокіни є групою поліпептидних медіаторів, що беруть участь у формуванні і регуляції захисних реакцій організму. До цитокінів відносяться інтерферони, колонієстимулюючі фактори, інтерлейкіни, хемокіни, трансформуючі ростові фактори, група факторів некрозу пухлин і деякі інші. Біологічні ефекти цитокінів реалізуються через специфічні клітинні рецепторні комплекси. Гіперпродукція цитокінів веде до розвитку системної запальної реакції і може слугувати причиною розвитку ряду патологічних станів. На рівні

організму цитокіни здійснюють зв'язок між імунною, нервовою, ендокринною, кровотворною та іншими системами і служать для їхнього залучення до організації і регуляції захисних реакцій [6].

Метою нашої роботи було дослідження можливого впливу на експресію MGMT таких цитокінів, як LIF (лейкемієінгібуєчий фактор), SCF (фактор стовбурових клітин) та IL-3 (інтерлейкін 3).

LIF є плейотропним цитокіном, який відноситься до родини IL-6 та має молекулярну масу від 38 до 67 кДа. Біологічна дія LIF здійснюється через взаємодію з рецептором LIF-R на зовнішній поверхні плазматичної мембрани клітин [7].

Інтерлейкін 3 являє собою сильно глікозильований білок з молекулярною масою 21–36 кДа. Він діє як гемопоетичний фактор росту, що стимулює проліферацію і функцію клітин всіх ростків кровотворення [8].

SCF — це цитокін, що бере участь у регуляції процесів диференціації клітин (зокрема, гемопоезу) [9]. Він може існувати як у вільній, так і у трансмембранній формі; біологічна дія SCF здійснюється опосередковано через тирозинкіназний рецептор (c-Kit) [10].

Матеріали і методи

В роботі використовували культури клітин людини різного походження: первинні фібробластоподібні клітини ВКФ, іморталізована клітинна лінія 4BL2, та пухлинна лінія Нер-2 (рак гортані). Використовували методики дослідження та умови експерименту описано в [11].

Результати і обговорення

Ідентифікацію білку MGMT в клітинному екстракті проводили за допомогою Western blot аналізу.

У досліджуваних клітинах виявлено дві форми MGMT: немодифікована, з молекулярною масою 22–24 кДа, та модифікована, з молекулярною масою 48–50 кДа. Це явище було нами описано раніше [11].

Можливий вплив цитокіну LIF на рівень експресії MGMT перевірявся з використанням клітин ВКФ та Нер-2. Отримані результати представлені на рис. 1.

В контрольному варіанті (пухлинні клітини) були присутні обидві форми білку — як немодифікована, так і модифікована. При цьому переважала немодифікована форма. Після обробки клітин LIF спостерігалось інгібування синтезу цього білку. Білок, що знаходився у немодифікованій формі, взагалі не виявлявся, а кількість білка, який перебував у модифікованій формі, практично не змінювалася.

В умовно нормальних первинних клітинах у контрольних зразках виявлялася лише модифікована форма білку. Після обробки клітин LIF спостерігалось незначне зростання рівню експресії ферменту.

Вплив ростових факторів IL-3 та SCF досліджувався з використанням іморталізованої лінії мезенхімальних клітин крові людини 4BL2. Результати дослідження представлені на рис. 2.

В контрольному варіанті спостерігаються обидві форми білку — як модифікована, так і немодифікована. Після обробки досліджуваними

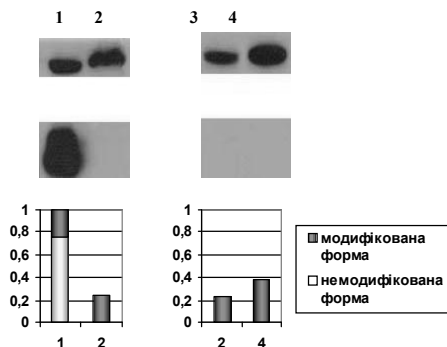


Рис. 1. Вплив цитокіну LIF на експресію АГТ в пухлинних клітинах людини (а) та в первинних клітинах людини (б):

1 — Her 2, інтактні; 2 — Her 2+LIF (20 мкг/мл); 3 — ВКФ, інтактні; 4 — ВКФ+LIF (20 мкг/мл)

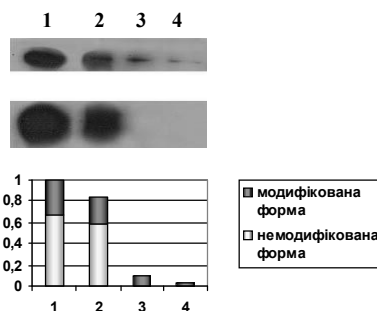


Рис. 2. Вплив ростових факторів IL-3 та SCF на експресію MGMT в лінії імморталізованих мезенхімальних клітин людини:

1 — Her 2, позитивний контроль; 2 — 4BL6, контроль; 3 — 4BL6+IL-3 (20 мкг/мл), 4 — 4BL6+SCF (20 мкг/мл)

цитокінами білок, що перебуває у немодифікованій формі, цілком зникає, а кількість білку, що знаходиться у модифікованій формі, значно знижується. Таким чином, ми маємо підстави говорити про інгібування синтезу MGMT під впливом згаданих цитокінів.

Висновки

Нами було показано, що цитокіни IL-3 та SCF у культурі клітин людини спричиняють виразний інгібуючий вплив на експресію репаративного ензиму MGMT.

Щодо цитокіну LIF, то характер його впливу на експресію цього ензиму носив дещо інший характер: практично не впливаючи на кількість білку, що знаходився у модифікованій формі, він спричиняв повне зникнення білку MGMT у немодифікованій формі.

Література

1. Pegg A.E. Mammalian O6-alkylguanine-DNA-alkyltransferase: regulation and importance in response to alkylation carcinogenesis and therapeutic agents // *Cancer Res.*— 1990.— Vol.50, №25.— P. 6119–6122.
2. Лукаш Л.Л., Манько В.Г., Луло В.В. Роль O6-алкілгуанін-ДНК-алкілтрансферази в репарації ушкоджень, індукованих алкілюючими сполуками // *Біополімери і клітина.*— 2001.— Т.17, №4.— С. 265–278.
3. Margison G.P., Povey A.C., Kaina B., Santibanez Koref M.F. Variability and regulation of O6-alkylguanine-DNA alkyltransferase // *Carcinogenesis.*— 2003.— Vol.24, №4.— P. 625–635.
4. Gerson S.L., Phillips W, Kastan M, Dumenco L.L, Donovan C. Human CD34+ hematopoietic progenitors have low, cytokine-unresponsive O6-alkylguanine-DNA alkyltransferase and are sensitive to O6-benzylguanine plus BCNU // *Blood.*— 1996.— Vol.1, №88.— P. 1649–55.
5. Natsume A., Ishii D., Wakabayashi T., Tsuno T., Hatano H., Mizuno M., Yoshida J. IFN- β Down-Regulates the Expression of DNA Repair Gene MGMT and Sensitizes Resistant Glioma Cells to Temozolomide // *Cancer Res.*— 2005.— Vol.65.— P. 7573–7579
6. Симбирцев А.С. Цитокины — новая система регуляции защитных реакций организма // *Цитокины и воспаление.*— 2002.— Т.1, №1.— С. 9–16.
7. Лобанок Е.С., Белянович Л.М., Лаврукевич Т.В., Волотовский И.Д. Эмбриональные стволовые клетки: направленная дифференцировка и возможности терапевтического применения // *Медицинские новости.*— 2006.— №5.— С. 7–13.
8. Вершигора А.Ю., Пастер С.У., Колибо Д.В. Имунология.— Киев.— 2005.— 599 с.
9. Kent D., Copley M., Benz C., Dykstra B., Bowie M., Eaves C. Regulation of hematopoietic stem cells by the steel factor / KIT signaling pathway // *Clin. Cancer Res.*— 2008.— Vol.14, №7.— P. 1926–1930.
10. Ronnstrand L. Signal transduction via the stem cell factor receptor-Kit // *Cell. Mol. Life Sci.*— 2004.— Vol.61, №19–20.— P. 2535–2548.
11. Лыло В.В., Манько В.Г., Серебрякова К.В., Лукаш Л.Л. Экспрессия репаративного фермента O6-алкілгуанін-ДНК алкілтрансферазы в линиях клеток млекопитающих *in vitro* // *Досягнення і проблеми генетики, селекції та біотехнології.*— 2007.— Т.1.— С. 117–121.

Резюме

Досліджувався вплив цитокинів LIF, IL-3 та SCF на експресію репаративного ензиму O6-алкілгуанін-ДНК алкілтрансферази (MGMT) в культурах клітин людини різного походження. Показано, що дані цитокини здатні спричинити зниження експресії MGMT в клітинах, проте характер впливу LIF дещо різнився від дії IL-3 та SCF.

Исследовалось влияние цитокинов LIF, IL-3 и SCF на экспрессию репаративного энзима O6-алкілгуанін-ДНК алкілтрансферазы (MGMT) в культурах клеток человека различного происхождения. Показано, что данные цитокины способны вызывать снижение экспрессии MGMT в культурах клеток, однако характер влияния LIF несколько отличался от действия IL-2 и SCF.

The influence of cytokines LIF, IL-3 and SCF on O6-alkylguanine-DNA alkyltransferase (MGMT) repair enzyme expression in human cell cultures with different origin has been studied. These cytokines have been shown to inhibit MGMT expression in cell cultures, but particular qualities of LIF influence something differs from IL and SCF effect.

¹МАЧУЛИНА С.А., ²ФИЛИПЦОВА О.В.

*¹Харьковский национальный университет им. В.Н. Каразина,
Украина, 61077, Харьков, пл. Свободы, 4;*

*²Национальный фармацевтический университет,
Украина, 61002, Харьков, ул. Пушкинская, 53, e-mail: philiptsova@yahoo.com*

ИЗУЧЕНИЕ БРАЧНОЙ АССОРТАТИВНОСТИ ПО ЛИЧНОСТНЫМ ХАРАКТЕРИСТИКАМ ЧЕЛОВЕКА

Для решения ряда социальных и медицинских проблем, возникающих в обществе, необходимо иметь точную информацию о структуре популяции и генетико-демографических процессах, протекающих в них. Одной из важных задач, при изучении структуры популяции, является анализ динамики параметров ее брачной структуры, а также факторов, приводящих к нарушению панмиксии. Одним из таких факторов является положительная ассортативность браков, при которой вероятность формирования брака при сходных фенотипах партнеров выше, чем в случае статистической случайности. В предположении того, что фенотип является прямым или косвенным отражением генотипа, положительная брачная ассортативность ведет к тому, что частоты генотипов из поколения в поколение изменяются, становятся меньше гетерозигот и больше гомозигот. Таким образом, ассортативность браков способствует усилению у потомства количественной выраженности генетических признаков, приводит к подразделенности популяций по этим признакам и имеет последствия аналогичные инбридингу.

Большинство исследований сходится на том, что браки формируются статистически не случайно по таким этнодемографическим характеристикам как: возраст, национальность, место рождения, профессия, уровень образования. Данные характеристики часто сопряжены с генетическими различиями, что может обусловить вторичную ассортативность по фенотипическим признакам. Также брачные предпочтения показаны по многим морфофизиологическим признакам — рост, цвет кожи, глаз, волос [1–4]. Высокая степень ассортативности браков отмечается по личностным характеристикам, прежде всего по уровню интеллекта [5], по антисоциальному поведению [6], алкоголизму [7]. Описана положительная ассортативность браков по психическим заболеваниям, в частности по шизофрении [8], маниакально-депрессивным психозам, а также по состоянию общей тревожности, паническим состояниям и различным фобиям [9].

По литературным данным, изучение брачной ассортативности и ее влияния на брачную структуру популяций проводится во всем мире. Однако, результаты этих исследований не применимы к конкретной популяции, которая отличается этническим составом, степенью урбанизации и другими демографическими показателями, религиозными и культурными особенностями, экономическим положением. В Украине параметры брачной структуры популяций были проанализированы на примере Харькова, Донецка, Полтавы, Киева, малых городов (Шостка, Тростянец, Красноград, Змиев). Поло-