

20. Bradford M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding / M. M. Bradford // *Analytical Biochemistry*. – 1976. – 72 (1–2). – 248–254.

21. Cieślak P. Vasculopathy and vasculitis in systemic lupus erythematosus / P. Cieślak, A. Hrycek, P. Kluciński // *Polish Archives of Internal Medicine*. – 2008. – 118(1–2). – P. 57–63.

22. da Silva F.F. Cardiovascular Risk Factors in the Antiphospholipid Syndrome / F. F. da Silva, R. A. Levy, J. F. de Carvalho // *Journal of Immunology Research*. – 2014. – P. 621–270.

23. Blum A. The antiphospholipid syndrome and endothelial function / A. Blum, C. Simsolo // *Israel Medical Association Journal*. – 2004. – 6(9). – P. 556–558.

24. Koniari I. Antiphospholipid syndrome; its implication in cardiovascular diseases: a review / I. Koniari, S. N. Siminelakis, N. G. Baikoussis // *Cardiothorac Surg*. – 2010. – 5. – P. 101.

25. Ruiz-Irastorza G. Stroke and antiphospholipid syndrome: the treatment debate / G. Ruiz-Irastorza, M. A. Khamashta // *Rheumatology (Oxford)*. – 2005. – 44(8). – P. 971–4.

26. Antiphospholipid antibodies and the risk of recurrence after a first episode of venous thromboembolism: a systematic review / D. Garcia, E. A. Akl, R. Carr, C. Kearon // *Blood*. – 2013. – 122(5). – P. 817–824.

Надійшла до редколегії 30.10.14

М. Бурлова-Васильєва, асп., Т. Вовк, канд. биол. наук,
Н. Кравченко, канд. биол. наук, А. Савчук, д-р биол. наук
Київський національний університет імені Тараса Шевченка, Київ, Україна,
В. Мельник, канд. мед. наук.
Национальный медицинский университет имени А.А. Богомольца, Киев, Украина

КРИТЕРИИ ЭНДОГЕННОЙ ИНТОКСИКАЦИИ ПРИ АТЕРОТРОМБОТИЧЕСКОМ ИШЕМИЧЕСКОМ ИНСУЛЬТЕ И КАРДИОЭМБОЛИЧЕСКОМ ИШЕМИЧЕСКОМ ИНСУЛЬТЕ

Определялась концентрация IgG, уровень олигопептидов и молекул средней массы в плазме крови больных атеротромботическим и кардиоэмболическим ишемическим инсультами. В исследовании приняли участие 122 пациента с диагнозом атеротромботический и кардиоэмболический ишемический инсульты и 40 относительно здоровых доноров. Концентрацию IgG определяли методом аффинной хроматографии на протеин А сепарозе. Уровень олигопептидов и молекул средней массы определяли по методике, описанной Николайчук В.В. и соавторами. Концентрация IgG увеличивалась с развитием кардиоэмболического ишемического инсульта, достигая $10,7 \pm 0,97$ мг/мл на 14 сутки, в то время как при поступлении на стационар показатель составлял $5,0 \pm 0,35$ мг/мл. При атеротромботическом ишемическом инсульте уровень молекул средней массы в плазме крови увеличивался в 3,35 раза, в то время как уровень олигопептидов увеличивался в 3,6 раза относительно показателей доноров. Кардиоэмболический ишемический инсульт сопровождался ростом уровня молекул средней массы в 2,6 раза, олигопептидов – в 2,5 раза относительно показателей доноров. Кардиоэмболический ишемический инсульт сопровождался увеличением концентрации IgG в плазме крови в 2 раза на 14-е сутки развития болезни относительно уровня, установленного при поступлении на стационар. При патологических состояниях наблюдался рост уровня молекул средней массы и олигопептидов, что указывает на активацию протеолитических процессов в организме.

Ключевые слова: атеротромботический ишемический инсульт, кардиоэмболический ишемический инсульт, IgG, молекулы средней массы.

M. Burlova-Vasylijeva, PhD stud., T. Vovk, PhD., N. Kravchenko, PhD., Savchuk O. DsC
Taras Shevchenko National University of Kyiv, Kyiv, Ukraine,
V. Melnyk, PhD.
Bogomolets National Medical University, Kyiv, Ukraine

CRITERIA OF ENDOGENOUS INTOXICATION IN PATIENTS WITH ATHEROTHROMBOTIC ISCHEMIC STROKE AND CARDIOEMBOLIC ISCHEMIC STROKE

To determine the concentration of IgG, the level of middle mass molecules and oligopeptides in blood plasma of patients with atherothrombotic and cardioembolic ischemic stroke. The study involved 122 patients diagnosed with atherothrombotic and cardioembolic ischemic stroke and 40 relatively healthy donors. The concentration of IgG was determined by affinity chromatography on protein A sepharose. The level of oligopeptides and middle mass molecules were determined by methods described by Nikolaichuk V. and co-authors. IgG concentration increased with the development of cardioembolic ischemic stroke, reaching $10,7 \pm 0,97$ mg/ml on the 14th day, while on admission to hospital was $5,0 \pm 0,35$ mg/ml. For atherothrombotic ischemic stroke the level of middle mass molecules in the plasma was 3.35 times higher, while the level of oligopeptides was 3.6 times higher relative to donors. Cardioembolic ischemic stroke was accompanied by 2.6 times higher level of middle mass molecules and by 2.5 times higher level of oligopeptides relative to donors. Cardioembolic ischemic stroke was accompanied by 2 times higher concentration of IgG in plasma on the 14th day of disease relative to the rate specified on admission to hospital. For both subtypes of ischemic stroke an increase in middle mass molecules and oligopeptides was observed, indicating the activation of proteolytic processes in the organism.

Keywords: atherothrombotic ischemic stroke, cardioembolic ischemic stroke, IgG, middle mass molecules.

УДК 577.112.7

Д. Цимбал, пров. інж., Д. Мінченко, канд. мед. наук,
І. Кривдюк, асп., О. Мінченко, проф.
Інститут біохімії імені О.В. Палладіна, Київ

ЕКСПРЕСІЯ ГЕНІВ *ATF3*, *FOXF1* ТА *CENPU* У КЛІТИНАХ ГЛІОМИ ЛІНІЇ U87 З ПРИГНІЧЕНОЮ ФУНКЦІЄЮ СИГНАЛЬНОГО ЕНЗИМУ ERN1 ЗА УМОВ ДЕФІЦИТУ ГЛУТАМІНУ І ГЛЮКОЗИ

Встановлено, що рівень експресії генів транскрипційних факторів *ATF3* та *FOXF1* за умов дефіциту глутаміну у середовищі збільшувався у клітинах гліоми лінії U87 з функціонально активним сенсорно-сигнальним ферментом ERN1, а рівень експресії гена *CENPU* за цих умов різко знижувався. В той же час, у клітинах гліоми з пригніченою активністю ERN1 рівень експресії гена *FOXF1* за умов дефіциту глутаміну істотно не змінювався, гена *ATF3* збільшувався, а гена *CENPU* зменшувався, причому пригнічення ERN1 значно посилювало ефект дефіциту глутаміну на експресію гена *ATF3*, але при цьому не змінювало чутливості гена *CENPU* до дефіциту цієї амінокислоти. Експресія гена *FOXF1* за умов дефіциту глюкози пригнічувалася, але лише у клітинах з функціонально активним ERN1. Пригнічення ERN1 зменшувало рівень експресії генів *ATF3* і *FOXF1* та посилювало експресію гена *CENPU* у клітинах гліоми за стандартних умов їх вирощування. Таким чином, гени *ATF3*, *FOXF1* та *CENPU* задіяні у регуляції процесів проліферації у клітинах гліоми і є чутливими до умов дефіциту глюкози і глутаміну в залежності від функції ензиму ERN1.

Ключові слова: експресія генів, *ATF3*, *FOXF1*, *CENPU*, клітини гліоми, дефіцит глюкози і глутаміну, ERN1.

Вступ. Відомо, що ріст злоякісних пухлин, в тому числі гліом, асоціюється з гіпоксією та дефіцитом поживних речовин, а також стресом ендоплазматичного ретикулу, що обумовлений накопиченням у ньому не зго-

рнутих чи неправильно згорнутих протеїнів [1 – 4]. Внутрішньоклітинною структурою, що надзвичайно чутлива до змін гомеостазу, є ендоплазматичний ретикулум, в якому проходить пост-трансляційна модифікація проте-

їнів, процес їх згортання, дозрівання перед переходом до апарату Гольджі, а також точний контроль їх структури. При порушенні гомеостазу чи дії різноманітних чинників спостерігається порушення процесів пост-трансляційної модифікації протеїнів та їх згортання, в результаті чого всі не згорнуті чи неправильно згорнуті протеїни затримуються і обов'язково знищуються. А тому реакція клітин на не згорнуті в ендоплазматичному ретикулумі протеїни є необхідною для збереження його функціональної цілісності і називається стресом ендоплазматичного ретикулуму, який опосередковується трьома сенсорно-сигнальними системами, локалізованими в ньому: ERN1/IRE1 (Endoplasmic Reticulum to Nuclei Signaling 1/Inositol Requiring Enzyme-1), PERK (PRK-like Endoplasmic Reticulum Kinase) та ATF6 (Activating Transcription Factor 6), але саме ERN1 (сигналювання від ендоплазматичного ретикулуму до ядра-1) є основною і найбільш консервативною сенсорно-сигнальною системою цього стресу [5 – 8]. За умов активації стресу ендоплазматичного ретикулуму не лише пригнічується синтез протеїнів на рибосомах, а і припиняється вхід до ендоплазматичного ретикулуму нових протеїнів, що синтезуються, а це сприяє як фолдингу протеїнів, які уже є в ньому, так і їх деградації не згорнутих протеїнів [9 – 12].

Відомо, що сенсорно-сигнальний ензим ERN1 має два різних каталітичних домени (один для серин/треонінової кінрази, а другий для ендорибонуклеази), які опосередковують залежне від ERN1 сигналювання, причому асоційована з ERN1 кінказа активність є відповідальною за аутофосфорилування цього ензиму і це фосфорилування є необхідним моментом для димеризації ERN1 та активації його ендорибонуклеази. Виявлено, що ендорибонуклеаза ERN1 є відповідальною не лише за ініціацію альтернативного сплайсингу пре-XBP1 (X-box binding protein 1) мРНК, а і за деградацію певних мРНК, контролюючи таким чином рівень їх експресії [10, 11]. Сплайс-варіант мРНК XBP1 кодує синтез транскрипційного фактора, що є більшим за розміром від основного варіанту і контролює експресію сотень генів, які мають відношення до стресу ендоплазматичного ретикулуму [10, 11], зокрема до регуляції процесів проліферації та смерті клітин [12, 13].

Сигнальний шлях стресу ендоплазматичного ретикулуму, що опосередкований ERN1, є тісно пов'язаним з процесами проліферації і росту злоякісних пухлин, оскільки виключення функції ERN1 призводить до пригнічення росту пухлин із клітин гліоми з повною блокадою функції цього сигнального шляху [9, 13, 14]. Добре відомо, що гліоми є надзвичайно агресивними пухлинами з вираженням ангіогенезом і посиленою інвазією клітин у нормальну паренхіму головного мозку і що чинники, які імітують ефекти ішемії, є асоційованими з ростом гліобластом і підвищують виживання пухлинних клітин, а також суттєво посилюють їх агресивність [9]. Детальне вивчення механізмів залежності трансформованих клітин від дефіциту поживних речовин, зокрема глюкози та глутаміну, є необхідною умовою для розробки нових терапевтичних стратегій сенсibiлізації клітин та пригнічення росту пухлин шляхом блокади механізмів їх проліферації та виживання.

Транскрипційний фактор ATF3 (Activating Transcription Factor 3) є залежним від циклічного аденозинмонофосфату і задіяний у регуляції клітинного циклу, апоптозу та проліферації пухлинних клітин, причому рівень його експресії позитивно корелює з посиленням ростом злоякісних пухлин [15]. Крім того, ATF3 приймає участь у адаптації клітин до зовнішніх та внутрішньоклітинних змін шляхом трансдукції сигналів з різних реце-

пторів, що може виражатися як в активації, так і в репресії експресії генів [15]. Відомо, що транскрипційний фактор FOXF1 (Forkhead box F1 transcription factor) відіграє важливу роль в регуляції процесів проліферації, міграції та виживання клітин, причому транскрипція гена *FOXF1* контролюється пухлинним супресором TP53 [16, 17]. Протеїн CENPU (centromere protein U), відомий ще як MLF1IP (myeloid leukemia factor-1 interacting protein) є транскрипційним репресором, що взаємодіє з Polo-Box і відіграє важливу роль в контролі "правильної" локалізації протеїнкінази PLK1 в мітотичних кінетофорах, причому його рівень є зниженим у пухлинах мозку, що вказує на можливу його участь у патогенезі гліом та можливо і інших злоякісних пухлинах [18]. Разом з тим, залежність експресії генів *ATF3*, *FOXF1* та *CENPU* у клітинах гліоми від дефіциту поживних речовин, зокрема глюкози та глутаміну, у середовищі і роль опосередкованого ERN1 сигналювання стресу ендоплазматичного ретикулуму при цьому вивчені ще недостатньо, що вимагає подальшого вивчення ролі цих генів у контролі процесів проліферації у цих клітинах.

Метою даної роботи було оцінити експресію генів, що кодують транскрипційні фактори *ATF3* і *FOXF1*, а також пухлинний супресор *CENPU*, які залучені до регуляції процесів проліферації клітин, у клітинах гліоми лінії U87 з пригніченим сигнальним ензимом ERN1 за умов дефіциту глюкози та глутаміну для визначення ролі сигнального ензиму ERN1 у механізмах регуляції експресії цих генів та їх можливу причетність до регуляції процесів проліферації у клітинах без функції ERN1.

Матеріали та методи. Робота проведена з використанням клітин гліоми лінії U87, отриманих із компанії "ATCC" (США). Клітини росли в середовищі DMEM (Dulbecco's modified Eagle's minimum essential medium; "Gibco", "Invitrogen", США) з високою концентрацією глюкози (4,5 г/л), що містило додатково 2 ммоль/л глутаміну, 10% ембріональної сироватки телят ("Equitech-Bio, Inc.", США), пеніцилін (100 одиниць/мл; "Gibco") та стрептоміцин (0,1 мг/мл; "Gibco") при температурі 37°C в інкубаторі з 5% CO₂. У цій роботі були використані дві сублінії цих клітин гліоми: 1) контрольні клітини (вектор), що були стабільно трансфіковані вектором pCDNA3.1 та 2) клітини (dnERN1) з повним пригніченням функції сенсорно-сигнального ензиму ERN1 домінант-негативною конструкцією dnERN1, що не мала кінказного та ендорибонуклеазного доменів ERN1. Пригнічення функції ензиму ERN1 було раніше оцінено по рівню фосфорилування ERN1 та утворенню альтернативного сплайс-варіанту XBP1 за умов індукованого тунікаміцином (10 мкг/мл протягом 2 годин) стресу ендоплазматичного ретикулуму [19]. При дослідженні впливу дефіциту глюкози та глутаміну клітини спочатку промивали від середовища вирощування, а потім додавали середовище DMEM ("Gibco") без глюкози або без глутаміну і витримували протягом 16 годин в інкубаторі.

РНК із клітин гліоми виділяли як було описано раніше [19, 20]. Осади РНК промивали 75 % етанолом, розчиняли у воді, вільній від рибонуклеаз, переосаджували етанолом для додаткового очищення від можливих залишків фенолу, знову розчиняли у воді і використовували для синтезу комплементарної ДНК. Синтез кДНК проводили за допомогою "QuantiTect Reverse Transcription Kit" ("QIAGEN", Німеччина) згідно протоколу виробника.

Рівень експресії генів *ATF3*, *FOXF1* та *CENPU* у клітинах гліоми визначали методом кількісної полімеразної реакції у реальному часі, використовуючи „Mx 3000P QPCR” ("Stratagene", La Jolla, CA, США) та "SYBRGreen Mix" ("AB gene", "Thermo Fisher Scientific", Epsom, Surrey, UK). Ампліфікацію проводили протягом 40 цик-

лів для всіх досліджених генів за таких температурних умов циклу: 95°C – 30 сек., 55°C -30 сек. та 72°C – 30 сек. Для ампліфікації кДНК ATF3 (activating transcription factor 3), відомого також як cyclic AMP-dependent transcription factor, були використані такі праймери: прямий (5'– CAAGTGCATCTTTGCCTCAA –3' та зворотний (5'– CCACCCGAGGTACAGACACT –3'). Нуклеотидні послідовності цих праймерів відповідають послідовності 1024 – 1043 та 1190 – 1171 кДНК ATF3 людини (GenBank номер NM_001674). Розмір ампліфікованого фрагмента 167 п.н.з. Ампліфікацію кДНК FOXF1 (forkhead F1) проводили за допомогою прямого (5'– AAGCCGCGCCTATTCTTACAT –3') та зворотного (5'– TGATGAAGCACTCGTTGAGC –3') праймерів, які відповідають послідовності 185 – 204 та 365 – 346 кДНК FOXF1 людини (GenBank номер NM_001451). Розмір ампліфікованого фрагмента 181 п.н.з. Для ампліфікації кДНК CENPU (centromere protein U), відомого також як MLF1IP (myeloid leukemia factor-1 (MLF1) interacting protein) та Polo-Box-Interacting Protein 1, були використані такі праймери: прямий – 5'– GGCTGGGTGAAAATGAGAAA –3' та зворотного – 5'– CGCTGTGTTTGAATAACCT –3'. Нуклеотидні послідовності цих праймерів відповідають послідовності 240 – 259 та 577 – 558 кДНК CENPU людини (GenBank номер NM_024629). Розмір ампліфікованого фрагмента 338 п.н.з. Ампліфікацію кДНК бета-актину (ACTB) проводили за допомогою прямого – 5'– GGACTTCGAGCAAGAGATGG –3' та зворотного – 5'– AGCACTGTGTTGGCGTACAG –3' праймерів. Нуклеотидні послідовності цих праймерів відповідають послідовності 747 – 766 та 980 – 961 кДНК ACTB людини (GenBank номер NM_001101). Розмір ампліфікованого фрагмента 234 п.н.з. Селекцію праймерів проводили у програмі "Primer3web", version 4.0.0 (<http://primer3.ut.ee/>). По рівню експресії мРНК гена бета-актину оцінювали

рівень експресії мРНК досліджуваних генів. Праймери були отримані з компанії "Sigma-Aldrich" (США).

Аналіз результатів дослідження експресії генів ATF3, FOXF1 and CENPU виконували за допомогою спеціальної комп'ютерної програми "Differential expression calculator" а статистичний аналіз з використанням *t*-тесту однієї проби (one sample *t* test). Значення експресії генів ATF3, FOXF1 and CENPU нормалізували по рівню експресії гена бета-актину і представляли у відсотках від контролю (100 %), але ефект дефіциту глюкози та глутаміну у клітинах (dnERN1) порівнювали з цими ж клітинами, що росли за присутності глюкози та глутаміну. Представлені середні значення $\pm m$ чотирьох експериментів.

Результати дослідження та їх обговорення. Як видно із даних, приведених у табл. 1, рівень експресії гена ATF3 за умов дефіциту глутаміну у середовищі посилюється у контрольних клітинах гліоми (вектор), що мають функціонально активний сенсорно-сигнальний ензим ERN1, (+59 %; $p < 0,05$) у порівнянні з цими ж клітинами гліоми, що росли у середовищі з глутаміном. Разом з тим, у клітинах з пригніченою активністю кінази та ендорібонуклеази ERN1 (dnERN1) рівень експресії гена ATF3 також посилюється за умов дефіциту глутаміну, але значно більшою мірою (+543 %; $p < 0,05$) при порівнянні з відповідним контролем, клітинами (dnERN1), які росли за присутності глутаміну (табл. 2). Це свідчить про значно більшу чутливість експресії гена ATF3 до дефіциту глутаміну за умов пригнічення ензиматичної активності сигнального ензиму ERN1. Крім того, було показано, що пригнічення ензиму ERN1 призводить до різкого зниження рівня експресії гена цього транскрипційного фактора у клітинах гліоми лінії U87 (-86 %; $p < 0,05$) у порівнянні з контрольними клітинами (вектор) за нормальних умов інкубації (табл. 1).

Таблиця 1. Рівень експресії генів ATF3, FOXF1 та CENPU у клітинах гліоми лінії U87, трансфікованих вектором pCDNA3.1 (Вектор) за даними кількісної полімеразної ланцюгової реакції: вплив дефіциту глутаміну та глюкози. Рівень експресії цих мРНК нормалізували за рівнем експресії гена бета-актину) і представляли у відсотках від контролю (контрольні клітини з вектором), прийнятого за 100 %; $n = 4$; * – $p < 0,05$ при порівнянні з контролем

№ п/п	Ген	Контроль (вектор)	Дефіцит глутаміну	Контроль (вектор)	Дефіцит глюкози	Контроль (вектор)	Пригнічення ERN1 (dnERN1)
1	ATF3	100	159 $\pm$ 7,8 *	100	150 $\pm$ 7,4 *	100	14 $\pm$ 1,3 *
2	FOXF1	100	223 $\pm$ 9,8 *	100	84 $\pm$ 4,2 *	100	47 $\pm$ 4,06 *
3	CENPU	100	42 $\pm$ 3,42 *	100	46 $\pm$ 2,56 *	100	274 $\pm$ 9,6 *

Встановлено також, що експресія гена ATF3 є чутливою до дефіциту глюкози, причому в обох типах клітин гліоми. Так, за умов дефіциту глюкози виявлено підвищення рівня експресії гена ATF3 на 50 % ($p < 0,05$)

у контрольних клітинах гліоми (табл. 1), а у клітинах з пригніченою функцією сигнального ензиму ERN1 експресія цього транскрипційного фактора посилювалася на 1807 % ($p < 0,05$) (табл. 2).

Таблиця 2. Рівень експресії генів ATF3, FOXF1 та CENPU у клітинах гліоми лінії U87, стабільно трансфікованих домінант-негативною конструкцією ензиму ERN1 (dnERN1), за даними кількісної полімеразної ланцюгової реакції: вплив дефіциту глутаміну та глюкози. Рівень експресії цих мРНК нормалізували за рівнем експресії гена бета-актину) і представляли у відсотках від контролю (контрольні клітини з dnERN1), прийнятого за 100 %; $n = 4$; * – $p < 0,05$ при порівнянні з контролем

№ п/п	Ген	Контроль (dnERN1)	Дефіцит глутаміну	Контроль (dnERN1)	Дефіцит глюкози
1	ATF3	100	643 $\pm$ 41,4 *	100	1907 $\pm$ 136 *
2	FOXF1	100	113 $\pm$ 9,36	100	92 $\pm$ 7,66
3	CENPU	100	45 $\pm$ 2,08 *	100	49 $\pm$ 2,12 *

Таким чином, пригнічення функції ERN1 значно посилює чутливість експресії гена ATF3 як до дефіциту глутаміну, так і глюкози.

Із даних, приведених у табл. 1 та 2 видно, що рівень експресії гена FOXF1 за умов дефіциту глутаміну у середовищі збільшується у контрольних клітинах гліоми (вектор) на 123 % ($p < 0,05$) при порівнянні з цими ж клітинами, що росли за присутності глюкози, але у клі-

тинах гліоми з пригніченою активністю кінази та ендорібонуклеази ERN1 за цих умов істотного зниження рівня експресії гена FOXF1 не виявляється при порівнянні з клітинами (dnERN1). У той же час, рівень експресії гена цього транскрипційного фактора за умов дефіциту глюкози зменшується у контрольних клітинах гліоми (вектор) (-16 %; $p < 0,05$) у порівнянні з цими ж клітинами (вектор), що росли з глюкозою, а пригнічення

ERN1 повністю елімінує ефект дефіциту глюкози на експресію цього гена при порівнянні з відповідним контролем (табл. 1 і 2). Для гена *FOXF1* також виявлено зниження рівня його експресії (–53 %; $p < 0,05$) у клітинах гліоми з пригніченою активністю сенсорно-сигнального ензиму ERN1 за нормальних умов інкубації у порівнянні з контрольними клітинами гліоми (вектор) (табл. 1). Таким чином, пригнічення функції ERN1 знімає чутливість експресії гена *FOXF1* як до дефіциту глутаміну, так і глюкози.

Дослідження експресії гена *CENPU* показало, що рівень його експресії різко зменшується (–58 %; $p < 0,05$) за умов дефіциту глутаміну як у контрольних клітинах гліоми (вектор), так і у клітинах з пригніченою функцією сигнального ензиму ERN1 (dnERN1) (–55 %; $p < 0,05$) (табл. 1 і 2). Більше того, за умов дефіциту глюкози рівень експресії гена *CENPU* також зменшується як у контрольних клітинах (вектор) (–54 %, $p < 0,05$), так і у клітинах (dnERN1) (–51 %, $p < 0,05$). Більше того, пригнічення функції ERN1 змінює рівень експресії гена *CENPU* у клітинах гліоми і за стандартних умов їх вирощування. Як видно із даних, представлених у табл. 1, рівень експресії цього гена підвищується у клітинах без функціонально активного ERN1 на 174 % ($p < 0,05$) у порівнянні з контрольними клітинами (вектор).

Таким чином, зниження рівня експресії гена *ATF3* у клітинах гліоми з пригніченим ERN1-опосередкованим сигнальним шляхом стресу ендоплазматичного ретикулу та підвищення його експресії за умов дефіциту глюкози і глутаміну, виявлене нами у клітинах гліоми, узгоджується з даними літератури [15, 16] про здатність транскрипційного фактора *ATF3* посилювати проліферацію та інвазію пухлинних клітин, зокрема через активацію експресії гена цикліну D1 та пригнічення *TP53*. Більше того, отримані нами результати про значне зниження рівня експресії гена *ATF3* узгоджується з даними літератури про зменшення інтенсивності проліферації клітин гліоми з пригніченою активністю ERN1 та росту пухлин з цих клітин [14, 20].

Транскрипційний фактор *FOXF1* також відіграє важливу роль у регуляції процесів проліферації, міграції та виживання клітин, причому транскрипція гена *FOXF1* контролюється пухлинним супресором *TP53* [17]. Як про-проліферативний фактор, він є необхідним для регуляції експресії генів, задіяних в ангиогенезі і сигналюванні VEGF, а тому отримані нами результати про зниження експресії гена *FOXF1* за умов пригнічення ERN1 та активації експресії за умов дефіциту глутаміну повністю узгоджуються з даними літератури [17]. Протеїн *CENPU* є транскрипційним репресором, його рівень є зниженим у пухлинах мозку [18], а тому посилення його експресії у клітинах гліоми з пригніченою активністю ERN1, а також за умов дефіциту глутаміну і глюкози, узгоджуються з його функцією як транскрипційного репресора.

Отримані нами результати розкривають деякі сторони молекулярних механізмів пригнічення проліферації клітин гліоми та росту гліом за умов інгібування сигнального ензиму ERN1 шляхом змін в експресії генів транскрипційних факторів *ATF3* та *FOXF1*, а також транскрипційного репресора *CENPU*, важливих для регуляції процесів проліферації і апоптозу, та механізмів регуляції їх експресії за дефіциту поживних речовин, зокрема глюкози та глутаміну в залежності від стресу ендоплазматичного ретикулу, опосередкованого сигнальним шляхом ERN1.

Таким чином, результати цієї роботи вказують на те, що експресія генів *ATF3*, *FOXF1* та *CENPU* у клітинах гліоми лінії U87 контролюється опосередкованою ERN1 сигнальною системою стресу ендоплазматичного ретикулу і може бути причетною до регуляції процесів проліферації у цих клітинах, оскільки білкові продукти

цих генів є ключовими у регуляції процесів проліферації, клітинного циклу та апоптозу. За умов дефіциту глюкози та глутаміну рівень експресії гена *ATF3* у клітинах гліоми збільшується, а гена *CENPU* знижується в залежності від функції сигнального ензиму ERN1.

Висновки.

1. Встановлено, що рівень експресії генів *ATF3* та *FOXF1* за умов дефіциту глутаміну у середовищі збільшувався у клітинах гліоми лінії U87 з функціонально активним сенсорно-сигнальним ензимом ERN1, а рівень експресії гена *CENPU* за цих умов різко знижувався.

2. Показано, що у клітинах гліоми з пригніченою активністю кінази та ендорибонуклеази ERN1 рівень експресії генів *FOXF1* за умов дефіциту глутаміну істотно не змінювався, *ATF3* збільшувався, а *CENPU* зменшувався, причому пригнічення ERN1 значно посилювало ефект дефіциту глутаміну на експресію гена *ATF3*, але не змінювало чутливості гена *CENPU* до дефіциту цієї амінокислоти у порівнянні з контрольними клітинами (вектор).

3. Встановлено, що за умов дефіциту глюкози рівень експресії генів *ATF3* та *CENPU* також змінювався, причому ці зміни були аналогічними до тих, що спостерігалися за умов дефіциту глутаміну в обох типах клітин гліоми, а гена *FOXF1* за цих умов пригнічувалася лише у контрольних клітинах (вектор).

4. Пригнічення функції ERN1 зменшувало рівень експресії генів *ATF3* і *FOXF1* та посилювало експресію гена *CENPU* у клітинах гліоми за стандартних умов їх вирощування.

5. Результати цієї роботи вказують на можливу причетність генів транскрипційних факторів *ATF3* і *FOXF1* та транскрипційного репресора *CENPU* до регуляції процесів проліферації у клітинах гліоми лінії U87 та на чутливість експресії цих генів до умов дефіциту глюкози і глутаміну в залежності від функції сигнального ензиму ERN1.

Список використаних джерел

1. Johnson A. B. Hypoxia induces a novel signature of chromatin modifications and global repression of transcription. / A. B. Johnson, N. Denko, M. C. Barton // *Mutation Research*. – 2008. – Vol. 640, N 1–2. – P. 174–179.
2. Clarke H. J. Endoplasmic reticulum stress in malignancy. / H. J. Clarke, J. E. Chambers, E. Liniker, S. J. Marciniak // *Cancer Cell*. – 2014. – Vol. 25, N 5. – P. 563–573.
3. Lee J. Unfolded protein response signaling and metabolic diseases. / J. Lee, U. Ozcan // *J. Biol. Chem.* – 2014. – Vol. 289, N 3. – P. 1203–1211.
4. Sakaki K. Interaction between quality control systems for ER protein folding and RNA biogenesis. / K. Sakaki, R. J. Kaufman // *Worm Journal*. – 2013. – Vol. 2, N 2. – P. 230.
5. Ferris S. P. Glycoprotein folding and quality-control mechanisms in protein-folding diseases. / S. P. Ferris, V. K. Kodali, R. J. Kaufman // *Disease Models & Mechanisms*. – 2014. – Vol. 7, N 3. – P. 331–341.
6. Hetz C. Targeting the unfolded protein response in disease. / C. Hetz, E. Chevet, H. P. Harding // *Nat. Rev. Drug Discov.* – 2013. – Vol. 12, N 9. – P. 703–719.
7. Aragón T. Messenger RNA targeting to endoplasmic reticulum stress signalling sites. / T. Aragón, E. van Anken, D. Pincus [et al.] // *Nature*. – 2009. – Vol. 457, N 7230. – P. 736–740.
8. Taouji S. Oligomerization in endoplasmic reticulum stress signaling. / S. Taouji, S. Wolf, E. Chevet // *Progress in Molecular Biology and Translational Science*. – 2013. – Vol. 117. – P. 465–484.
9. Integrated endoplasmic reticulum stress responses in cancer. / M. Moenner, O. Pluquet, M. Bouchecareilh, E. Chevet // *Cancer Research*. – 2007. – Vol. 67, N 22. – P. 10631–10634.
10. Manié S. N. Cellular mechanisms of endoplasmic reticulum stress signaling in health and disease. 3. Orchestrating the unfolded protein response in oncogenesis: an update. / S. N. Manié, J. Lebeau, E. Chevet // *American Journal of Physiology. Cell Physiology*. – 2014. – Vol. 307, N 10. – P. C901–C907.
11. Pluquet O. Posttranscriptional regulation of PER1 underlies the oncogenic function of IRE α . / O. Pluquet, N. Dejeans, M. Bouchecareilh [et al.] // *Cancer Research*. – 2013. – Vol. 73, N 15. – P. 4732–4743.
12. Lee J. p38 MAPK-mediated regulation of Xbp1s is crucial for glucose homeostasis. / J. Lee, C. Sun, Y. Zhou [et al.] // *Nature Medicine*. – 2011. – Vol. 17, N 10. – P. 1251–1260.
13. IRE1 signaling is essential for ischemia-induced vascular endothelial growth factor-A expression and contributes to angiogenesis and tumor growth in vivo. / B. Drogat, P. Auguste, D. T. Nguyen [et al.] // *Cancer Research*. – 2007. – Vol. 67, N 14. – P. 6700–6707.

14. Inositol-requiring enzyme 1 α is a key regulator of angiogenesis and invasion in malignant glioma. / G. Auf, A. Jabouille, S. Guérin [et al.] // Proceeding National Academy of Sciences U.S.A. – 2010. – Vol. 107, N 35. – P. 1555–1558.

15. Cao H. Expression and clinical significance of activating transcription factor 3 in human breast cancer. / H. Cao, Z. X. Yang // Iran. Journal of Basic Medicine Science. – 2013. – Vol. 16, N 11. – P. 1151–1154.

16. Upregulation of ATF-3 is correlated with prognosis and proliferation of laryngeal cancer by regulating Cyclin D1 expression / J. Feng, Q. Sun, T. Wu [et al.] // International Journal of Clinical and Experimental Pathology. – 2013. – Vol. 6, N 10. – P. 2064–2070.

17. Forkhead transcription factor FOXF1 is a novel target gene of the p53 family and regulates cancer cell migration and invasiveness

/ M. Tamura, Y. Sasaki, R. Koyama [et al.] // Oncogene. – 2014. – Vol. 33, N 40. – P. 4837–4846.

18. Regulation of myeloid leukemia factor-1 interacting protein (MLF1IP) expression in glioblastoma. / S. H. Hanissian, B. Teng, U. Akbar [et al.] // Brain Research. – 2005. – Vol. 1047, N 1. – P. 56–64.

19. The effect of hypoxia and ischemic condition on the expression of VEGF genes in glioma U87 cells is dependent from ERN1 knockdown. / D. O. Minchenko, K. I. Kubajchuk, O. V. Hubenia [et al.] // Advances in Biological Chemistry. – 2011. – Vol. 2, N 2. – P. 198–206.

20. High epiregulin expression in human U87 glioma cells relies on IRE1 α and promotes autocrine growth through EGF receptor. / Auf G., Jabouille A., Delugin M. [et al.] // BMC Cancer, 2013, Vol. 13(1). – P. 597.

Надійшла до редколегії 26.01.15

Д. Цимбал, вед. инж., Д. Минченко, канд. мед. наук., И. Кривдюк, асп., А. Минченко, проф.
Институт биохимии имени А.В. Палладина, Киев, Украина

ЕКСПРЕСІЯ ГЕНОВ ATF3, FOXF1 І CENPU В КЛЕТКАХ ГЛІОМИ ЛІНІЇ U87

С УГНЕТЕНОЮ ФУНКЦІЄЮ СИГНАЛЬНОГО ЕНЗИМА ERN1 ПРИ ДЕФИЦИТІ ГЛЮТАМИНА І ГЛЮКОЗИ

Установлено, що рівень експресії генів транскрипційних факторів ATF3 і FOXF1 при дефіциті глютаміна в середі збільшувався в клітках гліоми лінії U87 з функціонально активним сенсорно-сигнальним ферментом ERN1, а ген супресор пухликового росту CENPU при цих умовах знижувався. В той же час, в клітках гліоми з угнетеною активністю ERN1 рівень експресії гену FOXF1 при дефіциті глютаміна суттєво не змінювався, ген ATF3 збільшувався, а ген CENPU знижувався. Угнетення ERN1 значительно посилювало ефект дефіциту глютаміна на експресію гену ATF3, але при цьому не змінювало чутливості гену CENPU до дефіциту цієї амінокислоти. Експресія гену FOXF1 при дефіциті глюкози знижувалася, але тільки в клітках з функціонально активним ERN1. Угнетення ERN1 зменшувало рівень експресії генів ATF3 і FOXF1 і посилювало експресію гену CENPU в клітках гліоми при стандартних умовах їх вирощування. Таким чином, гени ATF3, FOXF1 і CENPU задіяні в регуляції процесів проліферації в клітках гліоми і є чутливими до дефіциту глюкози і глютаміна в залежності від функції ферменту ERN1.

Ключові слова: експресія генів, протеїнкінази, клітки гліоми, дефіцит глюкози і глютаміна, ERN1.

D. Tsymbal, leading engin., D. Minchenko, PhD., I. Kryvdiuk, PhD stud., O. Minchenko, prof.
Palladin Institute of Biochemistry, Kyiv, Ukraine

EXPRESSION OF ATF3, FOXF1 AND CENPU GENES IN U87 GLIOMA CELLS WITH SUPPRESSED FUNCTION OF ERN1 SIGNALING ENZYME UPON GLUTAMINE AND GLUCOSE DEPRIVATION

It was shown that the expression level of transcription factors ATF3 and FOXF1 genes is increased, but tumor suppressor gene CENPU is strongly decreased in U87 glioma cell with functionally active the sensor and signaling enzyme ERN1 upon glutamine deprivation condition. At the same time, in glioma cells with suppressed activity of ERN1 the expression level of FOXF1 gene does not change significantly upon glutamine deprivation, but ATF3 gene is increased and CENPU is decreased; however, the inhibition of ERN1 significantly enhances the sensitivity of CENPU gene to glutamine deprivation. The expression of FOXF1 gene is decreased upon glucose deprivation condition only in cells with functionally active ERN1. Inhibition of ERN1 down-regulates the expression levels of ATF3 and FOXF1 genes as well as up-regulates CENPU gene expression in glioma cells upon standard growing condition. Thus, the ATF3, FOXF1 and CENPU genes are related to the regulation of cell proliferation in glioma cells and are sensitive to glutamine and glucose deprivation in dependence of ERN1 enzyme function.

Key words: gene expressions, ATF3, FOXF1, CENPU, glioma cells, glucose and glutamine deprivations, ERN1.

UDC 616-006

T. Nikolaenko, PhD stud., N. Petruk, stud., D. Shelest, PhD stud., L. Garmanchuk, DSc
Taras Shevchenko National University of Kyiv, Kyiv

INFLUENCE OF VEGF, EGF AND THEIR ANTAGONISTS ON PROLIFERATIVE ACTIVITY AND GLUCOSE CONSUMPTION BY ENDOTHELIAL CELLS

In the article the proliferative activity of endothelial cells and endothelial cells of glucose consumption in terms of their previous incubation with EGF, VEGF and their antagonists.

Key words: VEGF, EGF, teralok, herceptin, anti-VEGF.

Introduction. Vascular endothelial cells cover the entire inner surface of blood vessels in the body. They play an important role in tissue homeostasis, fibrinolysis and coagulation, blood-tissue exchange, vasotonus regulation, the vascularization of normal and neoplastic tissues, and blood cell activation and migration during physiological and pathological processes [1].

Angiogenesis is a complex multistage process, the final stage of which is the formation of vascular network from endothelial cells. Proliferation and differentiation of them is regulated by a number of biologically active molecules and primarily depends on the presence of nutrient substrates and growth factors in microenvironment [2]. Angiogenesis is subject to a complex control system with proangiogenic and antiangiogenic factors. In adults, angiogenesis is tightly controlled by this "angiogenic balance", i.e., a physiological balance between the stimulatory and inhibitory signals for blood vessel growth. One of the most important proangiogenic factors is vascular endothelial growth factor (VEGF) [3].

One of the promising directions of chemotherapy in the last decades is the inhibition of tumor angiogenesis, the advantages of which are low cytotoxicity against normal

tissues and the absence of drug resistance, since the main target of angiogenesis are the endothelial cells [4]. In previous studies we have shown a stimulating effect of pro-angiogenic cytokines VEGF and EGF on proliferation of endothelial cells of MAEC line [5], but influence of these growth factors on the consumption of trophic substrates by cells from microenvironment was not examined. Glucose is an essential metabolic substrate of all mammalian cells for energy demand. It is taken up into cells by energy-independent transportation down its concentration gradient, which is mediated by glucose transporter proteins [6]. Transport of glucose across the plasma membrane of mammalian cells is the first rate-limiting step for glucose metabolism and is mediated by facilitative glucose transporter (GLUT) proteins. The main glucose transporter isoforms in the endothelial cells is GLUT1 [7].

Therefore the aim of this study was to investigate proliferative activity of endotheliocytes and glucose consumption by MAEC under the conditions of its preincubation with aforementioned pro-angiogenic cytokines and their antagonists.