

Висновки. Отже, нами встановлено, що досліджувані штами бактерій є авірулентними, не виявляють токсичної та токсигенної дії. Летальна доза для обох штамів перевищувала застосовані: ЛД₅₀ peros і ЛД₅₀ в/б > 15 млрд. клітин/мишу. Згідно отриманих результатів та відповідних нормативних матеріалів [1, 2, 3] каротинсинтезувальні штами *Bacillus* sp. 1.1 та *B. amyloliquefaciens* УКМ В-5113 віднесено до групи непатогенних мікроорганізмів, безпечних щодо теплокровних тварин.

Список використаних джерел

1. Lee J. *Bacillus* strains as feed additives: In vitro evaluation of its potential probiotic properties / J. Lee, I. Park; Y. Cho // Revista Colombiana de Ciencias Pecuarias. – 2012. – Vol. 25. – P. 577–585.
2. Sorokulova I. B. The safety of two *Bacillus* probiotic strains for human use / I. B. Sorokulova, I. V. Pinchuk, M. Denayrolles // Dig Dis Sci. – 2008. – Vol. 53. – P. 954–963.
3. Anadón A. Probiotics for animal nutrition in the European Union. Regulation and safety assessment / A. Anadón, M. Martínez-Larrañaga, M. Aranzazu Martínez // Regulatory Toxicology and Pharmacology. – 2006. – Vol. 45. – P. 91–95.

4. Hwang K. Y. The benefits of using bacillus as a probiotic / K. Y. Hwang, J. H. Cho, J. Y. Lee, K. D. Kang // Journal of animal and veterinary advances. – 2012. – Vol. 18. – P. 3457–3462.

5. Нечипуренко О. О. Пробиотичні властивості каротинсинтезувальних штамів *Bacillus* sp. 1.1 та *B. amyloliquefaciens* УКМ В-5113 / О. О. Нечипуренко, М. А. Хархота, Л. В. Авдеева // XIII з'їзд товариства мікробіологів України ім. С. М. Виноградського (1–6 жовт. 2013 р., Ялта) : зб. тез. і доп. – Ялта, 2013. – С. 499.

6. Chang M., Chang H.C. Development of a screening method for biogenic amine producing *Bacillus* spp. / M. Chang, H. C. Chang // International Journal of Food Microbiology. – 2012. – Vol. 153. – P. 269–274.

7. Animal Bioethics: Principles and Teaching Methods / eds by: M. Marie, S. Edwards, G. Gandini, M. Reiss, E. von Borell. – Wageningen, 2005. – 360 p.

8. Медицинские лабораторные технологии: руководство по клинической лабораторной диагностике / В. В. Алексеев, А. Н. Алипов, В. А. Андреев и др. – М.: ГЭОТАР-Медиа, 2013. – Т. 2. – 792 с.

9. Горальский Л. П. Основы гістологічної техніки у нормі та при патології / Л. П. Горальський, В. Т. Хомич, О. І. Кононський. – Житомир : Полісся, 2005. – 288 с.

10. Acute and subacute toxicity of tyramine, spermidine, spermine, putrescine and cadaverine in rats / H. P. Til, H. E. Falke, M. K. Prinsen, M. I. Willems // Food and chemical toxicology. – 1997. – Vol. 43. – P. 337–348.

Надійшла до редколегії 06.10.14

А. Нечипуренко, асп., М. Хархота, канд. біол. наук, Л. Авдеева, д-р мед. наук
Институт микробиологии и вирусологии им. Д.К. Заболотного НАН Украины, Киев, Украина

БЕЗОПАСНОСТЬ ШТАММОВ-ПРОДУЦЕНТОВ КАРОТИНОИДОВ *BACILLUS* SP. 1.1 И *B. AMYLOLIQUEFACIENS* УКМ В-5113 ДЛЯ ТЕПЛОКРОВНЫХ ЖИВОТНЫХ

Установлено, что штаммы-продуценты каротиноидов *Bacillus* sp. 1.1 и *B. amyloliquefaciens* УКМ В-5113 являются безопасными для теплокровных животных, а именно, авирулентны, не проявляют токсическое и токсигенное действие. Установлено отсутствие способности штаммов *Bacillus* sp. 1.1 и *B. amyloliquefaciens* УКМ В-5113 продуцировать путресцин и кадаверин. В опытах на мышах показано, что пероральное и внутрибрюшинное введение суспензий исследуемых штаммов бактерий, содержащих 15 млрд. клеток/мышь не вызывало гибель подопытных животных и не приводило к патоморфологическим изменениям тканей их органов. Таким образом, штаммы *Bacillus* sp. 1.1 и *B. amyloliquefaciens* УКМ В-5113 непатогенны и являются безопасными для теплокровных животных.

Ключевые слова: бактерии рода *Bacillus*, вирулентность, токсичность, токсигенность.

O. Nychypurenko, PhD stud., M. Kharhota, PhD., L. Avdeeva, D.Sc.
Zabolotnogo Institute of Microbiology and Virology NAS of Ukraine, Kyiv, Ukraine

SAFETY OF CAROTENE-PRODUCING STRAINS *BACILLUS* SP. 1.1 AND *B. AMYLOLIQUEFACIENS* UCM B-5113 FOR HOMIOOTHERMAL ANIMALS

It was detected that the strains of carotenoid-producing *Bacillus* sp. 1.1 and *B. amyloliquefaciens* UCM B-5113 are safe for warm-blooded animals, also avirulent and do not show toxic and toxigenic effect. It was determined the absence of the ability of strains of *Bacillus* sp. 1.1 and *B. amyloliquefaciens* UCM B-5113 to produce putrescine and cadaverine. In experiments on mice was shown that oral and intraperitoneal administration of suspensions of the strains of bacilli, containing 15 billion cells/mouse did not cause the death of experimental animals and did not lead to pathologic changes in the tissues of their bodies. Thus, strains *Bacillus* sp. 1.1 and *B. amyloliquefaciens* UCM B-5113 are non-pathogenic and safe for warm-blooded animals.

Keywords: bacteria of the genus *Bacillus*, virulence, toxicity, toxigenicity.

УДК 577.112.7

А. Харьковская, асп., Д. Мінченко, канд. мед. наук,
Д. Цимбал, студ., О. Мінченко, проф.
Институт біохімії НАН України, Київ

ЕКСПРЕСІЯ ГЕНІВ *IGFBP1*, *IGFBP2* ТА *IGF2BP3* У КЛІТИНАХ ГЛІОМИ З ПРИГНІЧЕНОЮ ФУНКЦІЄЮ СИГНАЛЬНОГО ЕНЗИМУ ERN1 ЗА УМОВ ДЕФІЦИТУ ГЛУТАМІНУ І ГЛЮКОЗИ

Протеїни, що зв'язуються з подібним до інсуліну фактором росту (IGF) або мРНК цього фактора росту відіграють важливу роль у регуляції процесів проліферації і, зокрема, росту злоякісних пухлин. Встановлено, що блокада обох ензиматичних функцій сенсорно-сигнального ензиму ERN1 (від ендоплазматичного ретикулу до ядра-1), що є основним компонентом сигналіну за умов стресу ендоплазматичного ретикулу, знижує рівень експресії генів *IGFBP1*, *IGFBP2* і *IGF2BP3* у клітинах гліоми лінії U87, що корелює з пригніченням проліферації цих клітин. Встановлено, що дефіцит глутаміну у середовищі призводить до посилення експресії гена *IGFBP1*, але істотно не змінює рівень експресії генів *IGFBP2* та *IGF2BP3* в обох типах клітин гліоми, причому цей ефект дефіциту глутаміну не залежав від пригнічення функції сигнального ензиму ERN1. В той же час, за умов дефіциту глюкози у середовищі рівень експресії генів *IGFBP2* та *IGF2BP3* знижувався в обох типах клітин гліоми, але пригнічення функції ERN1 посилювало цей ефект. Таким чином, результати даної роботи продемонстрували, що експресія генів *IGFBP1*, *IGFBP2* та *IGF2BP3* у клітинах гліоми лінії U87 є залежною від сигнального ензиму ERN1 і змінюється за умов дефіциту глутаміну та глюкози, але лише ефект дефіциту глюкози залежав від функції ERN1. Більше того, зниження рівня експресії генів *IGFBP1*, *IGFBP2* та *IGF2BP3* у клітинах гліоми за умов пригнічення обох ензиматичних активностей ERN1 може бути причетним до пригнічення проліферації цих клітин.

Ключові слова: експресія генів *IGFBP1*, *IGFBP2* і *IGF2BP3*, глутамін, глюкоза.

Вступ. Дефіцит поживних речовин є одним із факторів, що індукують стрес ендоплазматичного ретикулу і експресію великої групи генів, зокрема тих, що

контролюють процеси проліферації, а тому важливим фактором росту різних злоякісних пухлин, в тому числі і гліом [1, 2]. Відомо, що стрес ендоплазматичного рети-

© Харьковская А., Мінченко Д., Цимбал Д., Мінченко О., 2014

кулуму є реакцією на накопичення не згорнутих чи неправильно згорнутих протеїнів у ендоплазматичному ретикулумі і опосередковується трьома сенсорно-сигнальними системами, локалізованими в ендоплазматичному ретикулумі: ERN1 (від ендоплазматичного ретикулуму до ядра-1), PERK (подібна до PRK кіназа ендоплазматичного ретикулуму) та ATF6 (активуючий транскрипційний фактор 6), але саме ERN1 є головною сенсорно-сигнальною системою стресу ендоплазматичного ретикулуму [3 – 7]. За умов активації стресу ендоплазматичного ретикулуму спостерігається блокада синтезу протеїнів і надходження до ендоплазматичного ретикулуму нових протеїнів, що синтезуються, а це сприяє не лише фолдингу протеїнів, які уже є в ендоплазматичному ретикулумі, а і деградації не згорнутих протеїнів [8 – 11]. Все це необхідно для виживання клітин за умов стресу або їх смерті через механізми, асоційовані зі стресом ендоплазматичного ретикулуму.

Сенсорно-сигнальний ензим ERN1 є біфункціональним, оскільки має два різних каталітичних домени (серин/треонінової кінази та ендорибонуклеази), які опосередковують залежний від ERN1 сигналінг. Відомо, що асоційована з ERN1 протеїнкіназна активність аутофосфорилує цей ензим і що це фосфорилування є необхідним моментом його димеризації та активації ендорибонуклеази ERN1 [7]. Ця ендорибонуклеаза є відповідальною за деградацію певних мРНК та ініціацію альтернативного сплайсингу мРНК пре-ХВР1 (X-box binding protein 1) [9, 10]. Зрілий сплайс-варіант мРНК ХВР1 (ХВР1s) є матрицею для синтезу транскрипційного фактора, що контролює експресію декількох сотень генів, які мають відношення до стресу ендоплазматичного ретикулуму [10, 11], зокрема до регуляції процесів проліферації та смерті клітин [12, 13]. Також відомо, що фосфорилування ХВР1s протеїнкіназою р38 MAP та його взаємодія з регуляторною субодиницею фосфатиділінозитол 3-кінази збільшують ядерну транслокацію ХВР1s, а взаємодія з транскрипційним фактором FOXO1 (Forkhead box O1) сприяє опосередкованій протеосою деградації цього транскрипційного фактора [13, 14]. Сигнальний шлях ERN1 стресу ендоплазматичного ретикулуму тісно пов'язаний з ефектами ішемії і гіпоксії, а також процесами проліферації і росту злоякісних пухлин, оскільки було показано, що повна блокада функції цього сигнального шляху у клітинах гліоми та аденокарциноми легень призводить до пригнічення росту пухлин із цих клітин [9, 15, 16]. Відомо, що гліоми є надзвичайно агресивними пухлинами з вираженим ангіогенезом та посиленою інвазією клітин в нормальну паренхіму головного мозку і що як гіпоксія, так і чинники, що імітують ефекти ішемії, є асоційованими з ростом гліом, сприяють виживанню пухлинних клітин і посилюють їх агресивність [8]. Детальне вивчення механізмів залежності клітин від гіпоксії є необхідною умовою для розробки терапевтичних стратегій сенсibiлізації клітин та пригнічення ангіогенезу у клітинах пухлин шляхом блокади механізмів їх виживання.

Фактори IGFBP1, IGFBP2 та IGFBP3, що кодують синтез важливих регуляторів функції подібних до інсуліну факторів росту (IGF) відіграють ключову роль у регуляції росту злоякісних пухлин, змінюючи стабільність і функцію IGF, а також стабільність мРНК і ефективність трансляції [17–19]. Фактори IGFBP1 та IGFBP2 є протеїнами, що зв'язуються з подібними до інсуліну факторами росту і не лише захищають їх від деградації, а і істотно впливають на взаємодію IGF з їх рецепторами, змінюючи таким чином ефективність дії цих факторів росту [17, 18]. Більше того, для протеїнів родини

IGFBP показані також не опосередковані IGF функції. Фактор IGFBP2 стимулює процеси проліферації, виживання клітин і активує каскади сигнальних шляхів протеїнкіназ, що активуються міогеном (MAPK) [18]. Протеїн IGFBP3 має у своїй структурі КН домени, що важливі для зв'язування з мРНК і регуляції її стабільності та ефективності трансляції, причому він може зв'язуватися не лише з IGF2, а і з іншими мРНК [19]. Він посилює процеси проліферації і рівень його експресії є збільшеним у злоякісних пухлинах. На даний момент внесок факторів IGFBP1, IGFBP2 та IGFBP3 в реалізацію ефектів стресу ендоплазматичного ретикулуму і, зокрема, сигнального шляху ERN1 досліджений ще недостатньо, а тому вивчення їх ролі у контролюванні процесів проліферації клітин гліоми є надзвичайно важливим [18, 19].

Метою даної роботи було оцінити експресію генів, що кодують синтез факторів IGFBP1, IGFBP2 та IGFBP3, які задіяні в регуляції процесів проліферації, у клітинах гліоми лінії U87 з пригніченою функцією ERN1, основного сенсорно-сигнального ензиму стресу ендоплазматичного ретикулуму, за умов короткотривалого дефіциту глутаміну та глюкози у середовищі.

Матеріали та методи. Досліди проведені на клітинах гліоми лінії U87, що були отримані із компанії "ATCC" (США). Ростили їх у середовищі DMEM (Dulbecco's modified Eagle's minimum essential medium) з високою концентрацією глюкози (4.5 г/л) від компанії "Invitrogen" (США) при 37°C в інкубаторі з 5% CO₂. У це середовище додатково додавали 2 mM глутаміну, 10% ембріональної сироватки телят ("Equitech-Bio, Inc.", США), пеніцилін (100 одиниць/мл; "Gibco". США) та стрептоміцин (0.1 мг/мл; "Gibco"). Для проведення досліджень були використані дві сублінії цих клітин гліоми: контрольні клітини гліоми, що були стабільно трансфіковані вектором pcDNA3.1 (Вектор), які використовували як контроль 1, та клітини з повним пригніченням функції сенсорно-сигнального ензиму ERN1 домінант-негативною конструкцією dnERN1 що не мала кіназного та ендорибонуклеазного доменів ERN1 (dnERN1), які використовували як контроль 2 при дослідженні впливу на ці клітини дефіциту глюкози та глутаміну. Пригнічення функції ензиму ERN1 було оцінено раніше по рівню фосфорилування ERN1 та утворенню альтернативного сплайс-варіанту ХВР1 за умов індукваного тунікаміцином (10 мкг/мл протягом 2 годин) стресу ендоплазматичного ретикулуму [20]. При дослідженні впливу дефіциту глутаміну та глюкози клітини промивали фізіологічним розчином (рН 7,4) і інкубували у середовищі DMEM ("Gibco") без глутаміну або без глюкози протягом 16 годин.

РНК із клітин гліоми виділяли, як було описано у попередній роботі [20]. Осад РНК двічі промивали 75 % етанолом, розчиняли у воді, вільній від рибонуклеаз, переосаджували етанолом, знову розчиняли у воді і використовували для синтезу комплементарної ДНК (кДНК). Синтез кДНК проводили за допомогою QuantiTect Reverse Transcription Kit (QIAGEN, Німеччина) згідно протоколу виробника.

Рівень експресії різних генів *IGFBP1*, *IGFBP2* та *IGFBP3* у клітинах гліоми визначали методом кількісної полімеразної реакції, використовуючи апарат "Mx 3000P QPCR" фірми "Stratagene" (США) та реакційну суміш "SYBRGreen Mix" із компанії "AB gene" (Велика Британія). Для ампліфікації кДНК IGFBP1 (insulin-like growth factor binding protein 1) були використані такі праймери: прямий (5'– TATGATGGCTCGAAGGCTCT –3' та зворотний (5'– GAGACCCAGGGATCCTCTTC –3').

Нуклеотидні послідовності цих праймерів відповідають послідовностям 765 – 784 та 1020 – 1001 кДНК IGFBP1 людини (GenBank номер NM_000596). Розмір ампліфікованого фрагмента 256 пар нуклеотидних залишків (п.н.з.). Ампліфікацію кДНК IGFBP2 (insulin-like growth factor binding protein 2) проводили за допомогою прямого (5'– CCTCAAGTCGGGTATGAAGGAG –3') та зворотного (5'– CAACAGGAAGTGGACCAGGT –3') праймерів, які відповідають послідовностям 669 – 688 та 830 – 811 кДНК IGFBP2 людини (GenBank номер NM_000597). Розмір ампліфікованого фрагмента 172 п.н.з. Для ампліфікації кДНК IGF2BP3 (insulin-like growth factor II mRNA binding protein 3) also known as KOC1 (KH domain containing protein overexpressed in cancer) були використані такі праймери: прямий – 5'– GGCAAAACGGTGAATGAACT –3' та зворотний – 5'– GTCCACTTTGCAGAGCCTTC –3'. Нуклеотидні послідовності цих праймерів відповідають послідовностям 1785-1804 та 1983 – 1964 кДНК IGF2BP3 людини (GenBank номер NM_006547). Розмір ампліфікованого фрагмента 199 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 послідовностям 747 – 766 та 980 – 961 кДНК ACTB людини (GenBank номер NM_001101). Розмір ампліфікованого фрагмента 234 п.н.з. По рівню експресії мРНК гена бета-актину оцінювали кількість РНК, взятої для аналізу. Праймери були отримані з компанії "Sigma-Aldrich" (США).

Аналіз результатів дослідження експресії генів *IGFBP1*, *IGFBP2* та *IGF2BP3* виконували за допомогою спеціальної комп'ютерної програми "Differential

expression calculator", а статистичний аналіз за непараметричним аналогом *t*-теста Ст'юдента з використанням програмного забезпечення OriginPro 7.5. Значення експресії генів *IGFBP1*, *IGFBP2* та *IGF2BP3* нормалізували по рівню експресії гена бета-актину і представляли у відсотках від контролю, прийнятого за 100 %. Представлені значення $M \pm m$ чотирьох експериментів. Результати вважали достовірними при $P < 0,05$.

Результати дослідження та їх обговорення. Як видно із даних, приведених на рис. 1, пригнічення кінзної та ендорибонуклеазної активностей сенсорно-сигнального ензиму ERN1, основного сигнального шляху стресу ендоплазматичного ретикулу, призводить до зниження на 45 % ($P < 0,05$) рівня експресії гена *IGFBP1* у клітинах гліоми лінії U87 у порівнянні з контрольними клітинами, трансфікованими вектором рсDNA3.1 (Вектор). За умов дефіциту глутаміну у середовищі рівень експресії цього гена посилюється на 120 % ($P < 0,05$) як у контрольних клітинах гліоми (з нормальною функцією ензиму ERN1), так і у клітинах з пригніченою функцією цього сигнального ензиму (dnERN1). Ці результати вказують на те, що ефект дефіциту глутаміну на рівень експресії гена *IGFBP1* істотно не залежить від функціональної активності сигнального шляху, опосередкованого ERN1, оскільки ефект дефіциту глутаміну був подібним в обох типах клітин. В той же час, за умов дефіциту глюкози у середовищі рівень експресії гена *IGFBP1* у контрольних клітинах гліоми лінії U87 у порівнянні з контролем 1 також посилюється, але лише на 27 % ($P < 0,05$), а у клітинах гліоми без функції сигнального ензиму ERN1 цей ефект дефіциту глюкози у середовищі у порівнянні з контролем 2 не проявляється (рис. 1).

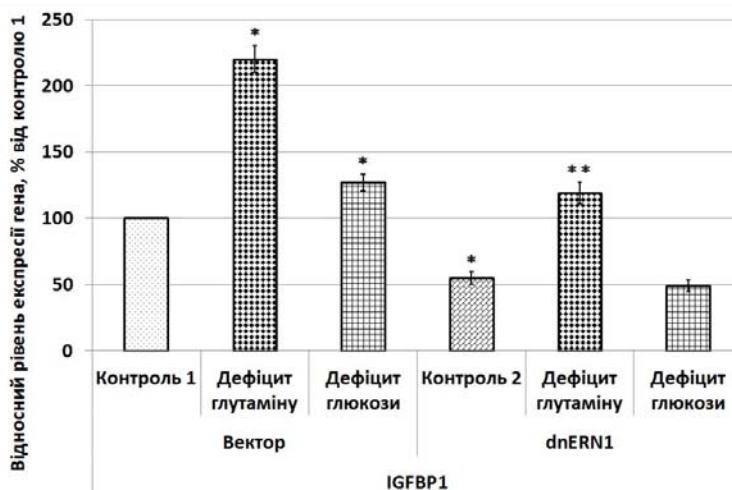


Рис. 1. Зміни рівня експресії гена *IGFBP1* у клітинах гліоми лінії U87, трансфікованих вектором рсDNA3.1 (Вектор) та клітин, стабільно трансфікованих домінант-негативною конструкцією ензиму ERN1 (dnERN1), за умов дефіциту глутаміну та глюкози у середовищі. Рівень експресії гена *IGFBP1* нормалізували за рівнем експресії гена бета-актину, причому отримані значення експресії цього гена у клітинах гліоми за умов дефіциту глутаміну або глюкози у контрольних клітинах гліоми (Вектор) порівнювали з контролем 1, прийнятим за 100 %, а у клітинах, трансфікованих dnERN1, – з контролем 2; $M \pm m$; $n = 4$; * – $P < 0,05$ при порівнянні з контролем 1, ** – $P < 0,05$ при порівнянні з клітинами, трансфікованими dnERN1 (контроль 2)

Таким чином, отримані результати свідчать про опосередкованість ефекту дефіциту глюкози на рівень експресії гена *IGFBP1* сигнальним шляхом стресу ендоплазматичного ретикулу ERN1.

Рівень експресії гена *IGFBP2* у клітинах гліоми лінії U87 за умов блокади ERN1 також призводить до зниження на 55 %; ($P < 0,05$) у порівнянні з контрольними клітинами, трансфікованими вектором (рис. 2A).

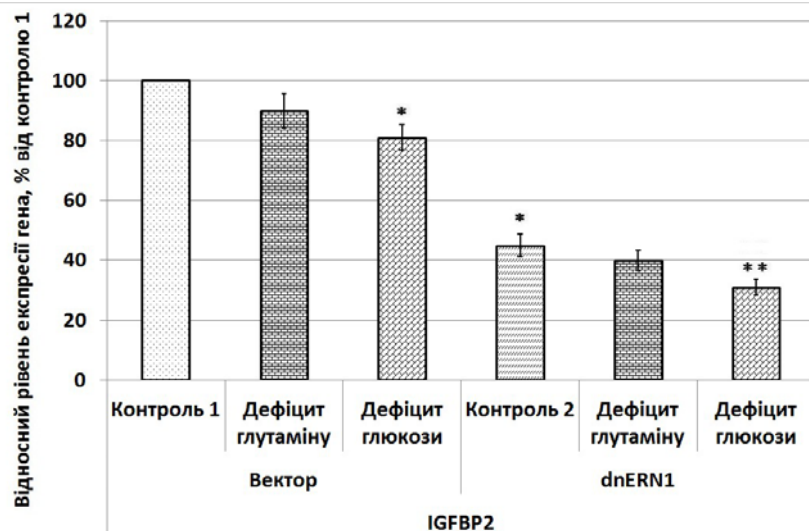


Рис. 2А. Зміни рівня експресії гена *IGFBP2* у клітинах гліоми лінії U87, трансфікованих вектором pсDNA3.1 (Вектор) та клітин, стабільно трансфікованих домінант-негативною конструкцією ензиму ERN1 (dnERN1), за умов дефіциту глутаміну та глюкози у середовищі. Рівень експресії гена *IGFBP1* нормалізували за рівнем експресії гена бета-актину, причому отримані значення експресії цього гена у клітинах гліоми за умов дефіциту глутаміну або глюкози у контрольних клітинах гліоми (Вектор) порівнювали з контролем 1, прийнятим за 100 %, а у клітинах, трансфікованих dnERN1, – з контролем 2; $M \pm m$; $n = 4$; * – $P < 0,05$ при порівнянні з контролем 1, ** – $P < 0,05$ при порівнянні з клітинами, трансфікованими dnERN1 (контроль 2)

В той же час, рівень експресії гена *IGFBP2* за умов дефіциту глутаміну у середовищі істотно не змінюється як у контрольних клітинах гліоми, так і у клітинах з пригніченою функцією сигнального ензиму ERN1. Ці результати вказують на те, що експресія гена *IGFBP2* у клітинах гліоми є резистентною до дефіциту глутаміну й істотно не залежить від функціональної активності сигнального шляху, опосередкованого ERN1. Із наведених на рис. 2 даних також видно, що за умов дефіциту глюкози у середовищі рівень експресії гена *IGFBP2* знижується на 19 % ($P < 0,05$) у контрольних клітинах гліоми лінії U87 у порівнянні з контролем, а у клітинах гліоми без функції сигнального ензиму ERN1 знижується на 31 %; ($P < 0,05$), тобто у цих клітинах ефект дефіциту глюкози у середовищі є більшим, порівняно з контроль-

ними клітинами. Таким чином, рівень експресії генів *IGFBP1* та *IGFBP2* у клітинах гліоми за умов дефіциту глюкози у середовищі змінюється по-різному за напрямком, але залежить від функції сигнального ензиму ERN1.

На рис. 2Б приведені результати електрофоретичного розділення в агарозному гелі продуктів ампліфікації генів *IGFBP2* та β -актину у контрольних клітинах гліоми лінії U87, трансфікованих вектором pсDNA3.1 (Вектор; 1 і 2) та клітин, стабільно трансфікованих домінант-негативною конструкцією ензиму ERN1 (dnERN1; 3 і 4), за умов дефіциту глутаміну у середовищі (2 і 4), де 1 – контроль 1, 3 – контроль 2. Отримані результати свідчать про відсутність у продуктах ампліфікації додаткових чи неспецифічних фрагментів.

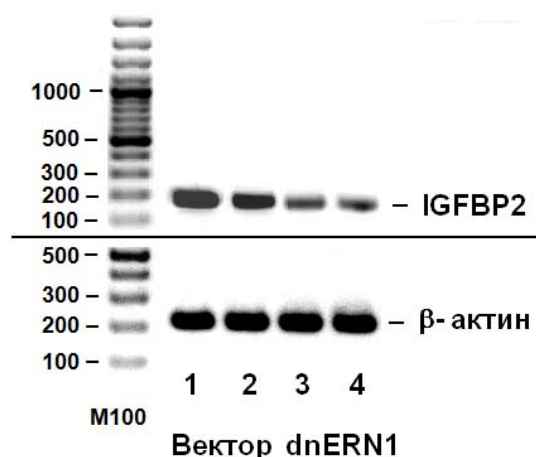


Рис. 2Б. Електрофореграма розподілення продуктів ампліфікації генів *IGFBP2* та β -актину у клітинах гліоми лінії U87, трансфікованих вектором pсDNA3.1 (Вектор) та клітин, стабільно трансфікованих домінант-негативною конструкцією ензиму ERN1 (dnERN1), за умов дефіциту глутаміну у середовищі. 1 – контроль 1, 3 – контроль 2, а 2 і 4 – за умов дефіциту глутаміну у контрольних клітинах (Вектор) та трансфікованих dnERN1, відповідно

Як видно з даних, приведених на рис. 3, за умов пригнічення функції сенсорно-сигнального ензиму ERN1 знижується на 60 % ($P < 0,05$) рівень експресії і гена *IGF2BP3*, білковий продукт якого зв'язується з мРНК IGF2 і контролює стабільність цієї мРНК та ефективність її трансляції, активуючи процеси проліферації

[19]. Також встановлено, що рівень експресії цього гена є резистентним до дефіциту глутаміну у середовищі в обох типах клітин гліоми, але знижується за умов дефіциту глюкози: у контрольних клітинах гліоми на 17 %, а у клітинах з пригніченою функцією сигнального ензиму ERN1 в значно більшій мірі – на 35 % (рис. 3).

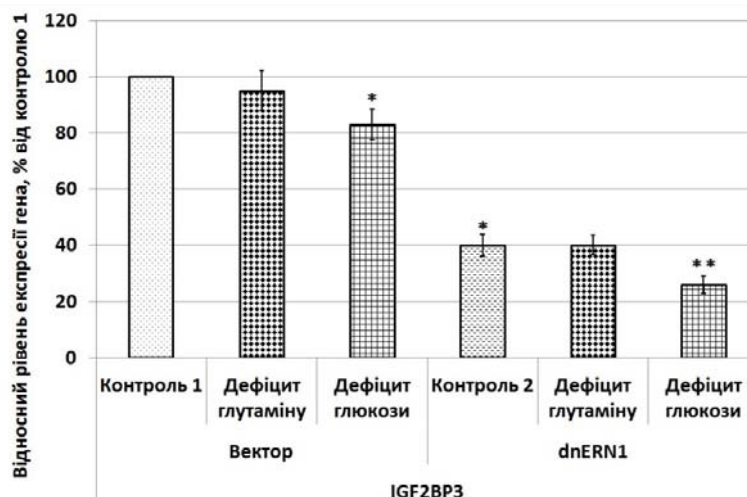


Рис. 3. Зміни рівня експресії гена *IGF2BP3* у клітинах гліоми лінії U87, трансфікованих вектором pcDNA3.1 (Вектор) та клітин, стабільно трансфікованих домінант-негативною конструкцією ензиму ERN1 (dnERN1), за умов дефіциту глутаміну та глюкози у середовищі. Рівень експресії гена *IGFBP1* нормалізували за рівнем експресії гена бета-актину, причому отримані значення експресії цього гена у клітинах гліоми за умов дефіциту глутаміну або глюкози у контрольних клітинах гліоми (Вектор) порівнювали з контролем 1, прийнятим за 100 %, а у клітинах, трансфікованих dnERN1, – з контролем 2; $M \pm m$; $n = 4$; * – $P < 0,05$ при порівнянні з контролем 1, ** – $P < 0,05$ при порівнянні з клітинами, трансфікованими dnERN1 (контроль 2)

Ці результати свідчать про залежність експресії гена *IGF2BP3* до умов дефіциту глюкози і про залежність цього процесу від сигнального ензиму ERN1. Більше того, отримані дані узгоджуються з даними інших авторів стосовно впливу нестачі глутаміну і глюкози у середовищі на експресію генів, що контролюють ангіогенез, і переважну залежність цих ефектів від функції сигнального ензиму ERN1 [15, 20].

Відомо, що фактори *IGFBP1*, *IGFBP2* та *IGF2BP3* є поліфункціональними протеїнами і відіграють важливу роль у регуляції росту злоякісних пухлин переважно як фактори, що контролюють стабільність подібних до інсуліну факторів росту, їх взаємодію з рецепторами IGF, а також стабільність і ефективність трансляції мРНК IGF2 та інших мРНК [17-19]. Рівень експресії цих факторів посилюється за пухлинного росту, і виявлене нами зниження рівня експресії генів *IGFBP1*, *IGFBP2* та *IGF2BP3* за умов блокади функції сигнального ензиму ERN1 узгоджується з даними літератури про пригнічення проліферації цих клітин та росту пухлин із них [15, 16]. Можна припустити, що зменшення рівня експресії генів *IGFBP1*, *IGFBP2* та *IGF2BP3* у клітинах гліоми лінії U87 за умов блокади обох ензиматичних активностей сигнального ензиму ERN1 вносить певний вклад у пригнічення проліферації клітин гліоми та росту пухлин із них. В той же час, для розшифровки молекулярних механізмів зниження рівня експресії генів *IGFBP1*, *IGFBP2* та *IGF2BP3* у клітинах гліоми з пригніченою функцією ензиму ERN1, як і за умов нестачі глюкози чи глутаміну, потрібні подальші поглиблені дослідження.

Таким чином, результати проведених досліджень продемонстрували залежність експресії генів *IGFBP1*, *IGFBP2* та *IGF2BP3* від функції сигнального ензиму ERN1 у клітинах гліоми лінії U87, а також залежність їх експресії від дефіциту глутаміну і глюкози у середовищі, а також ERN1, основного сигнального ензиму стресу ендоплазматичного ретикулу. Крім того, значне зниження рівня експресії генів *IGFBP1*, *IGFBP2* та *IGF2BP3* у клітинах гліоми з пригніченою функцією сигнального ензиму ERN1 корелює з пригніченням росту пухлин із цих клітин *in vivo* [15, 16] і може бути причетним до цього, оскільки ці фактори є ключовими у регуляції процесів проліферації та виживання клітин [17-19].

Висновки.

1. Встановлено, що пригнічення обох ензиматичних функцій біфункціонального сенсорно-сигнального ензиму

ERN1, основного сигнального ензиму стресу ендоплазматичного ретикулу, знижує рівень експресії генів *IGFBP1*, *IGFBP2* та *IGF2BP3* у клітинах гліоми лінії U87.

2. Показано, що рівень експресії гена *IGFBP1* посилюється, а генів *IGFBP2* та *IGF2BP3* – істотно не змінюється у контрольних клітинах гліоми за умов відсутності глутаміну у середовищі і що пригнічення сигнального ензиму ERN1 не змінює цей ефект.

3. Встановлено, що рівень експресії гена *IGFBP1* збільшується, а генів *IGFBP2* та *IGF2BP3* знижується у контрольних клітинах гліоми за умов відсутності глюкози у середовищі і що блокада сигнального ензиму ERN1 посилює вплив дефіциту глюкози на експресію всіх цих генів.

4. Результати досліджень свідчать про залежність експресії генів *IGFBP1*, *IGFBP2* та *IGF2BP3* у клітинах гліоми лінії U87 від функції ERN1, основного сенсорно-сигнального ензиму стресу ендоплазматичного ретикулу, а також про чутливість їх експресії до дефіциту глюкози, причому ця чутливість змінюється у клітинах з пригніченим ERN1.

Список використаних джерел

- Johnson A. B., Denko N., Barton M. C. Hypoxia induces a novel signature of chromatin modifications and global repression of transcription // *Mutation Research*. – 2008. – Vol. 640. – P. 174-179.
- Denko N. C. Hypoxia, HIF1 and glucose metabolism in the solid tumour // *Nature Reviews Cancer*. – 2008. – Vol. 8. – P. 705-713.
- Zhang K., Kaufman R.J. Signaling the unfolded protein response from the endoplasmic reticulum // *Journal of Biological Chemistry*. – 2004. – Vol. 279, № 25. – P. 25935-25938.
- Bi M., Naczk C., Koritzinsky M., et al. ER stress-regulated translation increases tolerance to extreme hypoxia and promotes tumor growth // *EMBO Journal*. – 2005. – Vol. 24, № 19. – P. 3470-34815.
- Aragón T., van Anken E., Pincus D., et al. Messenger RNA targeting to endoplasmic reticulum stress signalling sites // *Nature*. – 2009. – Vol. 457, № 7230. – P. 736-740.
- Fels D.R., Koumenis C. Focused Review: ER Stress and Cancer The PERK/eIF2 α /ATF4 Module of the UPR in Hypoxia Resistance and Tumor Growth // *Cancer Biology & Therapy*. – 2006. – Vol. 5, № 7. – P. 723-728.
- Korennykh A.V., Egea P.F., Korostelev A.A., et al. The unfolded protein response signals through high-order assembly of Ire1 // *Nature*. – 2009. – Vol. 457, № 7230. – P. 687-693.
- Moennner M., Pluquet O., Bouchecareilh M., Chevet E. Integrated endoplasmic reticulum stress responses in cancer // *Cancer Research*. – 2007. – Vol. 67, № 22. – P. 10631-10634.
- Romero-Ramirez L., Cao H., Nelson D., et al. XBP1 is essential for survival under hypoxic conditions and is required for tumor growth // *Cancer Research*. – 2004. – Vol. 64, № 17. – P. 5943-5947.
- Acosta-Alvear D., Zhou Y., Blais A., et al. XBP1 controls diverse cell type- and condition-specific transcriptional regulatory networks // *Molecular Cell*. – 2007. – Vol. 27. – P. 53-66.

11. Hollien J., Lin J.H., Li H., et al. Regulated Ire1-dependent decay of messenger RNAs in mammalian cells // *The Journal of Cell Biology*. – 2009. – Vol. 186, № 3. – P. 323-331.
12. Lee J., Sun C., Zhou Y., et al. p38 MAPK-mediated regulation of Xbp1s is crucial for glucose homeostasis // *Nature Medicine*. – 2011. – Vol. 17, № 10. – P. 1251-1260.
13. Zhou Y., Lee J., Reno C.M., et al. Regulation of glucose homeostasis through a XBP-1-FoxO1 interaction // *Nature Medicine*. – 2011. – Vol. 17, № 3. – P. 356-365.
14. Park S.W., Zhou Y., Lee J., et al. The regulatory subunits of PI3K, p85alpha and p85beta, interact with XBP-1 and increase its nuclear translocation // *Nature Medicine*. – 2010. – Vol. 16, № 4. – P. 429-437.
15. Drogat B., Auguste P., Nguyen D.T., et al. IRE1 signaling is essential for ischemia-induced vascular endothelial growth factor-A expression and contributes to angiogenesis and tumor growth in vivo // *Cancer Research*. – 2007. – Vol. 67. – P. 6700-6707.
16. Auf G., Jabouille A., Guérin S., et al. Inositol-requiring enzyme 1alpha is a key regulator of angiogenesis and invasion in malignant glioma //

Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA. – 2010. – Vol. 107, № 35. – P. 1555-1558.

17. Nakamura M., Takakura M., Fujii R., et al. The PRB-dependent FOXO1/IGFBP-1 axis is essential for progesterin to inhibit endometrial epithelial growth // *Cancer Letters*. – 2013. – Vol. 336, № 1. – P. 68-75.

18. Foulstone E.J., Zeng L., Perks C.M., Holly J.M. Insulin-like growth factor binding protein 2 (IGFBP-2) promotes growth and survival of breast epithelial cells: novel regulation of the estrogen receptor // *Endocrinology*. – 2013. – Vol. 154, № 5. – P. 1780-1793.

19. Hartmann E.M., Bea S., Navarro A., et al. Insulin-like growth factor binding protein 2 (IGFBP-2) promotes growth and survival of breast epithelial cells: novel regulation of the estrogen receptor // *Modern Pathology*. – 2012. – Vol. 25, № 9. – P. 1227-1235.

20. Minchenko D.O., Kubajchuk K.I., Hubenia O.V., et al. The effect of hypoxia and ischemic condition

on the expression of VEGF genes in glioma U87 cells is dependent from ERN1 knockdown // *Advances in Biological Chemistry*. – 2011. – Vol. 2, №2. – P. 198-206.

Надійшла до редколегії 06.10.14

А. Харьков, асп., Д. Минченко, канд. мед. наук, Д. Цимбал, студ., О. Минченко, проф.
Институт биохимии НАН Украины, Киев

ЭКСПРЕССИЯ ГЕНОВ IGFBP1, IGFBP2 И IGFBP3 В КЛЕТКАХ ГЛИОМЫ С ПОДАВЛЕННОЙ ФУНКЦИЕЙ СИГНАЛЬНОГО ЭНЗИМА ERN1 ПРИ ДЕФИЦИТЕ ГЛУТАМИНА И ГЛЮКОЗЫ

Протеины, которые связываются с подобным инсулину фактору роста (IGF) или мРНК этого фактора роста играют важную роль в регуляции процессов пролиферации и, в частности, роста злокачественных опухолей. Установлено, что блокада обеих ферментативных функций сенсорно-сигнального энзима ERN1 (от эндоплазматического ретикулума к ядру-1), что является основным компонентом сигналинга в условиях стресса эндоплазматического ретикулума, снижает уровень экспрессии генов IGFBP1, IGFBP2 и IGFBP3 в клетках глиомы линии U87, что коррелирует с угнетением пролиферации этих клеток. Установлено, что дефицит глутамин в среде приводит к усилению экспрессии гена IGFBP1, но существенно не влияет на уровень экспрессии генов IGFBP2 и IGFBP3 в обоих типах клеток глиомы, причем этот эффект дефицита глутамин не зависит от угнетения функции сигнального энзима ERN1. В то же время, в условиях дефицита глюкозы в среде уровень экспрессии генов IGFBP2 и IGFBP3 снижался в обоих типах клеток глиомы, но угнетение ERN1 усиливало этот эффект. Таким образом, результаты данной работы продемонстрировали, что экспрессия генов IGFBP1, IGFBP2 и IGFBP3 в клетках глиомы линии U87 является зависимой от сигнального энзима ERN1 и меняется в условиях дефицита глутамин и глюкозы, но только эффект дефицита глюкозы зависит от функции ERN1. Более того, снижение уровня экспрессии генов IGFBP1, IGFBP2 и IGFBP3 в клетках глиомы в условиях подавления обеих ферментативных активностей ERN1 может быть причастен к подавлению пролиферации этих клеток.

Ключевые слова: экспрессия генов IGFBP1, IGFBP2 и IGFBP3, глутамин, глюкоза.

A.Kharkova, PhD stud., D. Minchenko, PhD, D. Tsymbal, stud., O. Minchenko, prof.
Palladin institute of biochemistry of National Academy of Sciences of Ukraine NASU, Kyiv, Ukraine

EXPRESSION OF IGFBP1, IGFBP2 AND IGFBP3 GENES IN U87 GLIOMA CELLS WITH SUPPRESSED ERN1 SIGNALING ENZYME FUNCTION IN GLUTAMINE AND GLUCOSE DEPRIVATION CONDITIONS

Insulin-like growth factor binding proteins play an important role in the regulation of cell proliferation and malignant tumor growth. It was shown that blockade of both enzymatic functions of sensor and signaling enzyme ERN1 (from endoplasmic reticulum to nuclei-1), the major component of endoplasmic reticulum stress signaling, decreases the expression level of IGFBP1, IGFBP2 and IGFBP3 genes in U87 glioma cell. The decreased level of these gene expressions in glioma cells with ERN1 signaling enzyme loss of function correlates with suppression of cell proliferation. It was shown that glutamine deprivation condition leads to enhance the expression of IGFBP1 gene, but did not change significantly the expression of IGFBP2 and IGFBP3 genes in both types of glioma cells. Moreover, this effect of glutamine deprivation did not depend from suppression of ERN1 enzyme function. At the same time, the expression of IGFBP2 and IGFBP3 genes is decreased in glucose deprivation condition in both types of glioma cells and blockade of ERN1 signaling enzyme enhanced this effect. Thus, results of this investigation demonstrated that the expression of IGFBP1, IGFBP2 and IGFBP3 genes in U87 glioma cells is dependent from signaling enzyme ERN1 and is changed in glutamine and glucose deprivation conditions, but only effect of glucose deprivation was depended of ERN1 signaling enzyme function. Moreover, the decreasing of IGFBP1, IGFBP2 and IGFBP3 gene expressions in glioma cells with blockade of both enzymatic activities of ERN1 is possibly related to suppression of these cells proliferation.

Key words: expression of IGFBP1, IGFBP2 and IGFBP3 genes, glutamine, glucose.

УДК 612.362/364:577.181.5

Т. Довбинчук, асп., Т. Берегова, д-р біол. наук,
Г. Толстанов, д-р біол. наук
Київський національний університет імені Тараса Шевченка, Київ,
Л. Закордонь, канд. мед. наук
Національний медичний університет ім. О.О. Богомольця, Київ

ТРАНСПОРТ ВОДИ ЧЕРЕЗ ЕПІТЕЛІЙ ТОВСТОЇ КИШКИ ЩУРІВ ЗА ДІЇ АНТИБІОТИКУ ЦЕФТРИАКСОНУ

Досліджено вплив антибіотику цефтріаксону на транспорт води через епітелій товстої кишки щурів, в залежності від терміну введення та дози препарату, за використання методу перфузії ізольованої ділянки кишки *in situ*. В дозі 50 мг/кг/добу, цефтріаксон викликає діарею у 10% щурів, а в дозі 300 мг/кг/добу – у 25%. Цефтріаксон, в обох дозах, призводить до зменшення абсорбції води через епітелій товстої кишки щурів. Отриманий ефект був більш виразним після 14-ти денного курсу у порівнянні з 5-ти денним.

Ключові слова: товста кишка, цефтріаксон, діарея.

Вступ. За частотою призначення антибіотики займають друге місце серед лікарських засобів. Антибіотикотерапія часто супроводжується розвитком побічних ефектів, особливо з боку шлунково-кишкового тракту, а саме діареї [1]. Антибіотик-асоційована діарея (ААД) – це три або більше щоденних епізодів неоформлених випорожнень упродовж двох або більше днів на фоні прийому антибіотиків чи у віддалені терміни після їх

відміни (зазвичай упродовж 8 тижнів). ААД може розвиватися не залежно від шляху введення антибіотиків (пероральне, парентеральне і, навіть, трансвагінальне). На сьогодні виділяють два типи ААД: 1) діарея зумовлена мікроорганізмом *Clostridium difficile*, яка складає приблизно 20 % усіх випадків [2]; 2) решта 80 % – це ідіопатична діарея, тобто не з'ясованої етіології.