

M. Musienko, Dr. of Sci., Prof., Academician of National Academy of Agrarian Sciences of Ukraine, L. Ostapchenko, Dr. of Sci., Prof., N. Taran, Dr. of Sci., Prof., L. Batsmanova, PhD, Senior Research Scientist, V. Storozhenko, PhD
Taras Shevchenko National University of Kyiv, Kyiv, Ukraine

FROM KYIV STATE UNIVERSITY TO TARAS SHEVCHENKO STATE UNIVERSITY OF KYIV – THE FORMATION AND DEVELOPMENT OF BIOLOGICAL EDUCATION AND SCIENCE (1933–1945)

The historical overview of the development of biological education and science at the Kiev National Taras Shevchenko University for the period 1933–1945 years was given.

Key words: biological science, education, history.

УДК 577.112:616.128

О. Сторожук, студ., О. Руденко, студ., А. Білюк, асп., Л. Гарманчук, д-р біол. наук
Київський національний університет імені Тараса Шевченка, Київ

ГАММА-ГЛУТАМІНТРАНСПЕПТИДАЗНА АКТИВНІСТЬ В ТРАНСФОРМОВАНИХ КЛІТИНАХ ЗА ВПЛИВУ НА РЕЦЕПТОР ЕПІДЕРМАЛЬНОГО ФАКТОРА РОСТУ

Досліджено гамма-глутамінтранспептидазну активність (ГТТ активність) клітин ліній HeLa (рак шийки матки людини) та HepG2 (гепатокарцинома людини) за умов впливу на рецептор епідермального фактора росту мітогеном (EGF) та моноклональними антитілами до цього рецептора – герцептином. Фоновий рівень ГТТ активності в клітинах лінії HepG2 переважає майже в 10 разів ($p < 0,01$) порівняно з таким для клітин HeLa і становить $1,95 \pm 0,2$ нкат/мл. За впливу EGF та герцептину у клітинах HeLa достовірної різниці не виявлено, тоді як EGF в клітинах гепатокарциноми підсилює ГТТ активність на 20%, а герцептин, навпаки пригнічує в 2 рази ($p < 0,05$) у порівнянні з контролем. Виявлена різниця ГТТ активності у клітинних лініях HepG2 та HeLa свідчить про селективну експресію даного ферменту в HepG2 клітинах та може використовуватись як маркер малігнізації трансформованих клітин гепатоцелярного походження.

Ключові слова: гамма-глутамінтранспептидаза, герцептин, EGF.

Вступ. Численними дослідженнями показано, що зміна активності гамма-глутамінтранспептидази (ГТТ) пов'язана з ризиком розвитку захворювань серцево-судинної системи, є індикатором захворювань гепатобіліарної системи, маркером алкогольної інтоксикації та оксидативного стресу, проте її зв'язок з онкологічними захворюваннями залишається майже недослідженою областю [1]. Деякі експериментальні моделі пояснюють можливість ГТТ модулювати важливі редокс-чутливі функції, такі як антиоксидантний/антиоксидантний захист та клітинний проліферативний/апоптичний баланс, і його роль в пухлинній прогресії, інвазії і лікарській резистентності [2]. Крім того, перспективними виступають дослідження ролі ГТТ в якості біомаркера впливу певних канцерогенних ксенобіотиків, у тому числі стійких органічних забруднювачів [3].

Відомо, що ГТТ є мембранозв'язаним ферментом, який залучений у метаболізм глутатіону і традиційно розглядається як ланка системи захисту від окисного стресу. З іншого боку, нещодавно підтверджено, що окисно-відновні процеси, що випливають з ГТТ-опосередкованого метаболізму позаклітинного глутатіону можуть бути залучені в модулювання важливих функціональних аспектів пухлинних клітин [2, 4], а також доведена можливість використання ГТТ пухлиною в якості засобу для локальної активації протираківних ліків [5]. Проте, розподіл і концентрація ГТТ в різних типах пухлин різні, ще не знайдено кореляційних зв'язків між експресією ГТТ і стандартною клініко-патологічною картиною. Неопластичні перетворення в печінці призводять до підвищеної експресії ГТТ [6], однак механізми, що лежать в основі цього явища нині ще не повністю вивчені. Згідно отриманих даних в даному процесі беруть участь AP-1-подібний транскрипційний фактор шляхом активації позаклітинної ERK і p38 мітоген-активованої протеїнкінази (MAPK) [7], та активні форми кисню, які залучені в процес канцерогенезу та здатні впливати на експресію деяких генів, в тому числі ГТТ [8].

ГТТ експресується в багатьох типах клітин, проте активність даного ферменту різна в залежності від локалізації. Так, підвищена активність ГТТ характерна для тканин печінки, мозку, нирок та при злویкісних новоутворен-

нях [9], в тому числі в пухлинах з підвищеною експресією рецептора епідермального фактора росту (EGF), оскільки EGF виступає одним з основних індукторів клітинної проліферації, міграції та формування метастазів.

Мета дослідження полягала у порівнянні гамма-глутамінтранспептидазної активності в клітинах ліній HeLa та HepG2, визначенні кореляційних зв'язків між активністю даного фермента та впливом специфічних модифікаторів рецептору епідермального фактора росту – мітогену EGF та герцептину (гуманізованих моноклональних антитіл до рецептору).

Об'єкт і методи дослідження. Для дослідження ГТТ активності було використано лінії пухлинних клітин – HeLa (аденокарцинома шийки матки людини) та HepG2 (гепатокарцинома людини). Клітини вирощували до повного моношару в культуральному середовищі RPMI-1640 (Sigma, США) із додаванням 10% ембріональної телячої сироватки (Sigma, США), 2 мМL-глутаміну (Sigma, США) за стандартних умов культивування (5% CO₂, 100% вологості, 37°C) в чашках Петрі або 6-ти лункових планшетах. Клітини розсіювали в концентрації 2×10^5 кл/мл, після досягнення моношару додавали герцептин та EGF як описано [10] та інкубували 72 години. Після закінчення терміну інкубації клітини разом із середовищем інкубації відбирали, переосаджували центрифугуванням, визначали концентрацію живих клітин та співвідношення живих і мертвих після зафарбовування останніх трипановим синім. В середовищі інкубації визначали рівень ГТТ активності, для чого використовували тест-набір для оцінки загальної активності гамма-глутамінтранспептидази (Філісідіагностика, Україна). Принцип методу полягає в тому, що під дією ГТТ глутаміновий залишок з у-L-(+)-глутамін п-4-нітроаніліда переходить на дипептидний акцептор гліцилгліцин. При цьому вивільнюється хромоген п-нітроанілін. Оптичну щільність реакційного розчину вимірювали після зупинки ферментативної реакції оцтовою кислотою при довжині хвилі 405 нм за допомогою мультилункового спектрофотометра (BioTek). Для визначення абсолютних показників ГТТ активності проводили порівняння одержаних показників як в розрахунку на 1 мЛ культурального середовища, так і на кількість

клітин. Представлені показники в нанокаталах/мл та на 1×10^4 живих клітин

Статистичний аналіз одержаних результатів проводили з використанням програм статистичного пакету аналізу даних Microsoft Excel 2010. Для оцінки достовірності виявлених змін застосовували t-критерій Стьюдента, достовірність значень приймалася при $p < 0,05$.

Результати та їх обговорення. Першим етапом нашого дослідження, було порівняння двох ліній куль-

тивованих клітин HepG2 та HeLa за гамма-глутамінтранспептидазною активністю. Виявлено, що пухлинні клітини гепатоцелюлярної аденокарциноми HepG2 проявили майже 10-ти кратне переважаючого показника в порівнянні з клітинами HeLa (рис.1). Згідно одержаних результатів було показано, що рівень активності ферменту ГТТ у пухлинних клітинах HepG2 становив $1,95 \pm 0,1$ нкат/мл, тоді як аналогічний показник в клітинах лінії HeLa становив $0,34 \pm 0,07$ нкат/мл.

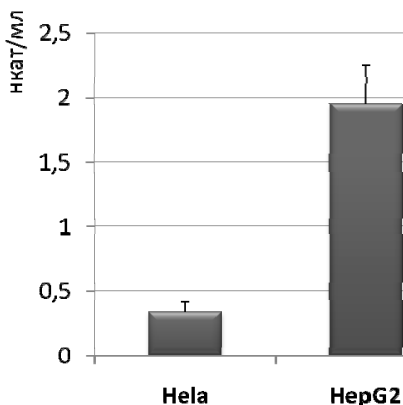


Рис.1. Гамма-глутамінтранспептидазна активність в середовищі інкубації клітин (нкат/мл/10000 кл)

Отримані результати щодо гамма-глутамінтранспептидазної активності вказують на те, що даний фермент виявляє більшу специфічність до клітин гепатоцелюлярної аденокарциноми, оскільки саме гепатоцити є основним місцем синтезу одних біологічно активних речовин, катаболізму інших та бар'єром на шляху токсинів. Ці процеси протікають за участі глутатіону, а отже й неможливі без ГТТ, тому саме цей фермент може використовуватись як маркер при визначенні дисфункції печінки, а зміна його активності слугує для оцінки ступеня ураження та деструктивних змін в печінці. Клітини HeLa мають епітеліальне походження, тому й проявили значно меншу ГТТ активність.

Відомо, що EGF є сильним мітогеном, прискорює процеси клітинного поділу, сприяє міграції та в деяких

випадках клітинної трансформації. Багато типів пухлин характеризуються підвищеними рівнями експресії EGF, тому нами був обраний саме цей мітоген в якості досліджуваного агента. При додаванні до клітин модифікаторів рецептора епідермального фактора росту було виявлено, що реакція клітин HeLa майже не підвищувалась за дії EGF та не пригнічувалась під впливом герцептину (рис 2A). В той же час ГТТ активність у клітинній лінії HepG2 при додаванні до культури клітин EGF збільшилась на 20 % відносно контролю ($p < 0,05$), а при додаванні герцептину зменшилась на 51 % відносно контролю ($p < 0,05$) (рис.2Б).

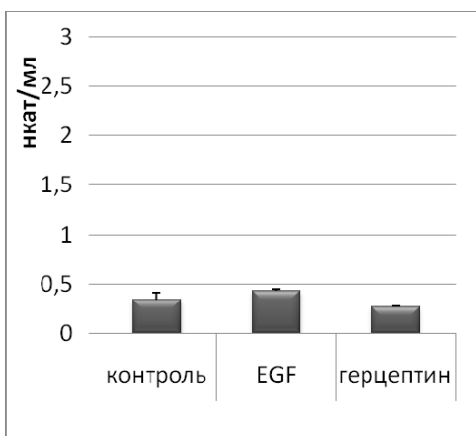


Рис.2А. Гамма-глутамінтранспептидазна активність в клітинній лінії HeLa за дії герцептину та EGF

Відсутність відмінностей в ГТТ активності клітин HeLa за дії досліджуваних модифікаторів EGF-рецептора може бути пов'язана не лише з тим, що немає певної різниці, а й з чутливістю методу за яким визначали ГТТ-активність. Щодо клітин гепатоцелюлярного походження, то результати підтверджують дані про стимулюючу дію EGF на клітини, тому можна розглядати пря-

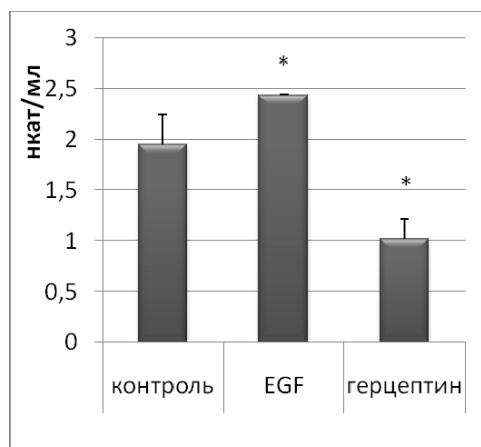


Рис.2Б. Гамма-глутамінтранспептидазна активність в клітинній лінії HepG2 за дії герцептину та EGF

мі кореляційні зв'язки між підвищенням проліферативної активності, синтетичними процесами в клітині та активністю ГТТ. Зменшення активності даного ферменту під впливом герцептину в 2 рази можна пояснити тим, що відбувається перехрещення сигнальних шляхів, опосередкованих впливом на рецептор епідермального фактора росту та їх гальмування.

Висновки. Отримані експериментальні дані виявляють різницю ГТТ активності у клітинних лініях HepG2 та HeLa, що свідчить про селективну експресію даного ферменту в цих клітинах та може використовуватись як маркер малігнізації трансформованих клітин гепатоцелюлярного походження. Зміну ферментативної активності ГТТ в клітинах HepG2 – збільшення за впливу EGF та зниження за впливу герцептину можна використовувати як додаткову характеристику метаболізму трансформованих гепатоцитів при дослідженні різних сполук.

Список використаних джерел

1. Strasak A. M. Association of gamma-glutamyltransferase and risk of cancer incidence in men: a prospective study / A. M. Strasak, K. Rapp, L. J. Brant [et al.] // *Cancer Research*. – 2008. – Vol. 68. – P. 3970–3977.
2. Pompella A. Glutamyltransferase, redox regulation and cancer drug resistance / Pompella A, Corti A, Paolicchi A. [et al.] // *Current Opinion Pharmacology*. – 2007. – Vol. 7. – P. 360–366.
3. Lee D. H. Association between serum concentrations of persistent organic pollutants and g-glutamyltransferase: results from the National Health and Examination Survey 1999–2002 / Lee D.H., Jacobs D.R. // *Clinical Chemistry*. – 2006. – Vol. 52. – P. 1825–1827.

4. Paolicchi A. Glutathione catabolism as a signaling mechanism / Paolicchi A., Dominici S., Pieri L. et al // *Biochemical Pharmacology*. – 2002. – Vol. 64. – P. 1027–1035.

5. Dilda P. J. Metabolism of the tumor angiogenesis inhibitor 4-(N-(S-glutathionylacetyl)amino)phenylarsinous acid / P. J. Dilda, E. E. Ramsey, A. Corti et al // *Journal Biological Chemistry*. – 2008. – Vol. 238. – P. 35428–35434.

6. Roomi M. W. Preneoplastic liver cell foci expansion induced by thioacetamide toxicity in drug-primed mice / M. W. Roomi, K. Gaal, Q. X. Yuan et al // *Experimental and Molecular Pathology*. – 2006. – Vol. 81. – P. 8–14.

7. Zhang H. 4-Hydroxynonenal induces rat gamma-glutamyltranspeptidase through mitogen-activated protein kinase-mediated electrophile response element/nuclear factor erythroid 2-related factor 2 signaling / H. Zhang, H. Liu, K. E. Iles et al // *American Journal Respiratory Cell Molecular Biology*. – 2006. – Vol. 34. – P. 174–181.

8. Pandur S. Gamma-glutamyltransferase is up-regulated after oxidative stress through the Ras signal transduction pathway in rat colon carcinoma cells / S. Pandur, S. Pankiv, M. Johannessen et al // *Free Radical Research*. – 2007. – Vol. 41. – P. 1376–1384.

9. Corti A. Gamma-glutamyltransferase of cancer cells at the crossroads of tumor progression, drug resistance and drug targeting / A. Corti, M. Franzini, A. Paolicchi, A. Pompella. // *Anticancer Research*. – 2010. – Vol. 30. – P. 1169–1182.

10. Nikulina V. V. A combined effect of herceptin and theralok with EGF on MCF-7 breast cancer cells / V. V. Nikulina, L. V. Garmanchuk, L. I. Ostapchenko et al // 13th International conference St.Gallen "Primary therapy of early breast cancer". 13–16 march 2013. – Switzerland, 2013.

Надійшла до редколегії 24.03.15

О. Сторожук, студ., О. Руденко, студ., А. Билук, асп., Л. Гарманчук, д-р біол. наук
Київський національний університет імені Тараса Шевченка, Київ, Україна

ГАММА-ГЛУТАМИНТРАНСПЕПТИДАЗНА АКТИВНОСТЬ В ТРАНСФОРМИРОВАННЫХ КЛЕТКАХ ПРИ ВОЗДЕЙСТВИИ НА РЕЦЕПТОР ЭПИДЕРМАЛЬНОГО ФАКТОРА РОСТА

Исследована гамма-глутаминтранспептидазная активность (ГТТ активность) клеток линий HeLa (рак шейки матки человека) и HepG2 (гепатокарцинома человека) в условиях воздействия на рецептор эпидермального фактора роста митогеном (EGF) и моноклональные антитела к этому рецептору – герцептином. Фоновый уровень ГТТ активности в клетках линии HepG2 преобладал почти в 10 раз ($p < 0,01$) по сравнению с таковым для клеток HeLa и составлял $1,95 \pm 0,2$ нкат / мл. По воздействию EGF и Герцептина в клетках HeLa достоверной разницы не обнаружено, тогда как EGF в клетках гепатокарциномы усиливал ГТТ активность на 20%, а герцептин, наоборот подавлял в 2 раза ($p < 0,05$) по сравнению с контролем. Вывялена разница ГТТ активности в клеточных линиях HepG2 и HeLa свидетельствует о селективной экспрессии данного фермента в HepG2 клетках и может использоваться как маркер малигнизации трансформированных клеток гепатоцелюлярного происхождения.

Ключевые слова: гамма-глутаминтранспептидаза, герцептин, EGF.

О. Storozhuk, stud., O. Rudenko, stud., A. Bilyuk., PhD stud, L. Garmanchuk, Dr. of Sci.
Taras Shevchenko National University of Kyiv, Kyiv, Ukraine

GAMMA-GLUTAMINTRANSPEPTIDASIC ACTIVITY IN TRANSFORMED CELLS EFFECTED ON EPIDERMAL GROWTH FACTOR RECEPTOR

Researched gamma-glutamyltranspeptidase activity (GGT activity) of HeLa cell line (human cervical cancer) and Hep G2 (human hepatocarcinomas) the influence on epidermal grow factor by mitogen and monoclonal antibodies to this receptor – herceptin. Background levels of GGT activity in Hep G2 cells lines prevailed almost 10 times ($p < 0,01$) comparing with HeLa cells and was $1,95 \pm 0,2$ nkat/ml. Was discovered that influence of EGF and herceptin on HeLa cells does not cause significant differences, while EGF that effected hepatocarcinoma cells increase GGT activity on 20%. Herceptin, conversely inhibit twice ($p < 0,05$) comparing with controls. The observed difference GGT activity in cell lines HeLa and Hep G2 shows the selective expression of this enzyme in Hep G2 cells and can be used as a marker of malignancy transformed cells of hepatocellular origin.

Key words: gamma-glutamyltranspeptidase, herceptin, EGF.

УДК 561.381/.382: 551.793.9:551.4.032 (477)

Т. Карпюк, асп., Л. Безусько, канд. біол. наук
Інститут ботаніки імені М. Г. Холодного НАН України, Київ,
А. Безусько, канд. біол. наук
Національний університет "Києво-Могилянська академія", Київ

ПАЛЕОХОРОЛОГІЯ *SELAGINELLA SELAGINOIDES* (L.) P. BEAUV. EX MART. ET SCHRANK ТА *DIPHASIASTRUM ALPINUM* (L.) HOLUB НА РІВНИННІЙ УКРАЇНІ В ПІЗНЬОМУ ДРІАСІ

Наводяться дані про наявність в спорово-пилкових спектрах відкладів пізнього дріасу рівнинної частині України спор *Selaginella selaginoides* і *Diphasiastrum alpinum*. Ці два види вищих спорових рослин представлені в третьому виданні Червоної книги України (2009) і в даний час беруть участь у формуванні рослинності високогір'я Українських Карпат. Встановлено, що в пізньому дріасі (стадіальне похолодіння останнього кліматичного ритму пізньольодовиков'я) *Selaginella selaginoides* і *Diphasiastrum alpinum* входили до складу перигляціальних угруповань лісової, лісостепової та степової зон України. Отримані палеопалінологічні матеріали дозволили зробити висновок про те, що *Selaginella selaginoides* була поширена, як на правобережній, так і на лівобережній частинах цих зон. Поширення *Diphasiastrum alpinum* було обмежено правобережною частиною лісової та степової зон України. Розроблені перші карти-схеми розповсюдження *Selaginella selaginoides* і *Diphasiastrum alpinum* на території рівнинної України в пізньому дріасі.

Ключові слова: палеопалінологія, палеохорологія, *Diphasiastrum alpinum*, *Selaginella selaginoides*, пізній дріас, Україна.

Вступ. Реконструкція поширення в просторі та часі видів, представлених в "Червоній книзі України" [27], є одним з актуальних аспектів сучасних палеохорологічних досліджень [9; 10; 19; 20]. Перспективними модель-

ними таксонами є представники вищих спорових рослин [11]. Серед них цікавими об'єктами для вивчення є ті, що сьогодні поширені тільки у високогірній флорі Карпат, а протягом квартеру брали участь у формуван-