

37. Palumbo J.S. Fibrinogen is an important determinant of the metastatic potential of circulating tumor cells / J.S. Palumbo [et.al] // Blood. – 2000. – Vol 96. – P. 3302-3309.

38. Rampling M.W. Hyperviscosity as a complication in a variety of disorders / M.W. Rampling // Seminars in Thrombosis and Hemostasis. – 2003. – Vol.29, №5. – P. 459-465.

39. Raval G.N. Patel D.D., Parekh L.Y. et al. Evaluation of serum sialic acid, sialtransferase and sialo-proteins in oral cavity cancer / G.N. Raval, D.D. Patel, L.Y. Parekh [et al.] // Oral. Dis. – 2003. – Vol.9, № 3. – P. 119-128.

40. Sahni A. Fibrinogen synthesized by cancer cell augments the proliferative effect of fibroblasts growth factor-2 (FGF-2) / A. Sahni [et.al] // J. Thromb. Haemost. – 2008. – Vol 6. – P. 176-183.

41. Sahni A. FGF-2 binding to fibrin(ogen) is required for augmented angiogenesis / A. Sahni [et.al] // Blood – 2006. – Vol 107. – P. 126-131.

42. Seaman G.V.F. Red cell agins. Surface charge density and sialic acid content of density-fractionated human erythrocytes / G.V.F. Seaman, R.J. Knox, F.J. Nordt, D.H. Regan // Blood. – 1977 – Vol. 50. – P. 1001-1011.

43. Seebacher V. The prognostic value of plasma fibrinogen levels in patients with endometrial cancer: a multi-centre trial / V. Seebacher [et.al] // British Journal of Cancer. – 2010. – Vol 102. – P. 952-956.

44. Simmich T. Sialic acid – an acute phase reactant and concomitant of tumors / T. Simmich, A. Dehne, N. Laube, K.H. Frank // Z. Med. Zab. Diagn. – 1991. – Bd.32, №.3-4. – S. 188-192.

45. Takeuchi H. Pretreatment plasma fibrinogen level correlates with tumor progression and metastasis in patients with squamous cell carcinoma of the esophagus / H. Takeuchi [et.al] // J. Gastroenterol. Hepatol. – 2007. – Vol 22. – P. 2222-2227.

Надійшла до редколегії 09.06.16

Ю. Бурлака, науч. сотр., Н. Гринь, науч. сотр., О. Голобородько, ст. науч. сотр., канд. биол. наук, С. Веревка, зав. лабораторії, д-р биол. наук
Государственное Учреждение "Институт отоларингологии имени проф. А.С. Коломийченко НАМН Украины", Киев

ИССЛЕДОВАНИЕ АГРЕГАЦИИ ЭРИТРОЦИТОВ У БОЛЬНЫХ РАКОМ ГОРТАНИ

Проведено сравнение показателей агрегации эритроцитов у больных раком с такими в контрольной группе (условно здоровые лица). Установлено, что у больных раком гортани с II-й и III-й стадиями опухолевого процесса на фоне повышения степени и времени агрегации относительно соответствующих контрольных данных, происходит одновременное снижение ее скорости. Кроме того, проведенное исследование показало повышение уровня молекул средней массы и фибриногена в плазме крови больных: более существенные их нарушения наблюдались при III-й стадии онкологического процесса чем при II-й. Содержание сialовых кислот был увеличен при II-й и III-й стадиях рака гортани в одинаковой степени по сравнению с контрольным показателем. Выявлены разнонаправленные изменения основных параметров агрегатограм эритроцитов. Наиболее значительные нарушения степени агрегации эритроцитов отмечается при II-й стадии онкологического процесса. Рост уровней молекул средней массы, фибриногена и сialовых кислот в плазме крови больных раком гортани указывает на наличие у них метаболической интоксикации и острой фазы воспаления, степень выраженности которых в определенной степени зависит от стадии заболевания.

Ключевые слова: рак гортани, эритроциты, агрегация, молекулы средней массы, фибриноген, сialовые кислоты.

Iu.B. Burlaka, fellow researcher, N.V. Gryn', fellow researcher, O.P. Goloborodko, senior researcher, Ph.D,
S.V. Verevka, head of laboratory, Dr.Sci. Biol
National Academy of Medical Sciences of Ukraine prof. O.S. Kolomyichenko Institute of Otolaryngology, Kyiv, Ukraine

INVESTIGATION OF ERYTHROCYTE AGGREGATION IN PATIENTS WITH LARYNGEAL CANCER

It was compared evaluation of results of erythrocytes aggregation parameters in patients with laryngeal cancer compared to the healthy persons. It was found that in patients with laryngeal cancer II-d and III-d stage of the tumor process against the background of increasing the degree of aggregation and the time relative to the corresponding reference data, there is a simultaneous decrease in its speed of aggregation. In addition, the study has shown increase in average weight molecules and fibrinogen levels in the blood plasma of patients with laryngeal cancer, to a lesser extent – with the II-d stage of the disease, and their more significant violations were observed in the III-d stage of the cancer process. Sialic acid content was increased at II and III-d stages of cancer of the larynx in the same degree compared to the healthy persons. It was established opposite changes of basic parameters of erythrocytes aggregation. The most significant violations of aggregation degree were observed in the II-d stage of the cancer process. Growing of levels of the average weight molecules, fibrinogen and sialic acid in the blood plasma of patients with laryngeal cancer indicates the presence of metabolic intoxication and the acute phase of inflammation, the severity of which to a certain extent depends on the stage of the disease.

Keywords: laryngeal cancer, erythrocytes, aggregation, average weight molecules, fibrinogen, sialic acid.

УДК 577.27, 57.083.3, 616.006

М. Гром, асп.
Київський національний університет ім. Тараса Шевченка, Київ,
Л. Яковенко, канд. біол. наук, Л. Сидорик, канд. біол. наук, О. Корнелюк, д-р біол. наук,
Інститут молекулярної біології та генетики НАН України, Київ,
В. Григоренко, д-р мед. наук, М. Вікарчук, лікар
Інститут урології НАМН України, Київ

ТИРОЗИЛ-тРНК СИНТЕТАЗА ТА ЇЇ ОКРЕМІ ДОМЕНИ ВІРОГІДНІ АУТОІМУННІ КОМПОНЕНТИ ПАТОГЕНЕЗУ РАКУ ПЕРЕДМІХУРОВОЇ ЗАЛОЗИ

Показано статистично значиме підвищення рівнів аутоантитіл до тирозил-тРНК синтетази та її окремих доменів з прозапальними та ангіогенними властивостями у пацієнтів з раком передміхурової залози у порівнянні з такими клінічно здорових донорів. Максимальна аутоагресія спостерігалась до С-кінцевого домену ферменту, найнижчий рівень аутосенсibiliзації було показано до N-кінцевого модуля тирозил-тРНК синтетази.

Ключові слова: тирозил-тРНК синтетаза, аутоантитіла, рак передміхурової залози.

Вступ. Рак передміхурової залози є гетерогенним за своїми біологічними властивостями, що не дозволяє сподіватися на однаково позитивні результати терапії у різних пацієнтів [2, 22]. Розуміння ключових молекулярних процесів при злоякісній трансформації залози дозволить персоналізувати лікування та досягти максимального терапевтичного ефекту. Дослідження останніх років звертаються до вивчення особливостей пухлинного ангіогенезу та ролі хронічного запалення, що часто супроводжує канцерогенез передміхурової залози, але загальної думки з приводу агентів запалення та ключових молекул ангіогенезу поки немає [25, 19].

Тирозил-тРНК синтетаза (ТирРС) належить до класу високо консервативних ферментів, що виконують ключову функцію на дорибосомному етапі біосинтезу білка. Ферменти каталізують реакцію аміноацилювання при якій відбувається приєднання амінокислоти до відповідної тРНК [18, 35]. У ході еволюції аміноацил-тРНК синтетази (ААРС) набули додаткових структур та доменів, а разом з ними і здатності здійснювати неканонічні функції залучаючись у різноманітні клітинні процеси [11]. Нові властивості синтетази можуть бути реалізовані через цитоплазматичні, ядерні чи позаклітинні форми ферментів та впливати на клітинний сигналінг, імунну

відповідь, ангиогенез [23, 8]. Через таку багатофункціональність ферменти часто є причиною або учасниками патогенезу різних захворювань [21]. ААРС можуть бути залучені до розладів нервової системи [20, 16, 24], аутоімунних захворювань, зокрема "антисинтетазного синдрому" [30, 12, 17], та зляканої трансформації [13].

Повнорозмірний фермент ТирРС ссавців є процитокином [34]. За стресових умов він може бути секретований з цитоплазми у зовнішньоклітинне середовище та розщеплений ферментом на зразок лейкоцитарної еластази на два окремі фрагменти, кожен з яких володіє своїми цитокиновими властивостями [27, 28]. N-кінцевий каталітичний домен (міні-ТирРС) з мотивом Glu-Leu-Arg (ELR) є потужним промотором ангиогенезу [3] а також здатен залучати до місця запалення поліморфоядерні лейкоцити [4, 29]. C-кінцевий домен за амінокислотною послідовністю має високу гомологію з активною формою прозапального цитокиноподібного білка людини Endothelial-Monocyte-Activating Polypeptide (EMAP II) [36] з ангиогенними властивостями, та здійснює подібний вплив [15, 33].

Здатність ААРС залучатись до патогенезу захворювань з одного боку, та запальні і ангиогенні властивості окремих доменів ТирРС з іншого, робить синтетазу потенційним учасником зляканої трансформації передміхурової залози. Окрім того, домени синтетази можуть не лише сприяти запаленню при патології завдяки своїм функціям, а й виступати у ролі аутоантигенів. Наслідком подібної аутосенсibilізації може бути хронічне запалення, яке сприяє прогресуванню захворювання та часто є причиною хибно позитивних тестів на PSA (Prostate Specific Antigen – антиген специфічний для тканини передміхурової залози) [25], що ускладнює своєчасну постановку діагнозу.

Дослідження рівнів антитіл проти тирозил-тРНК синтетази може не лише вказувати на наявність хронічного запалення передміхурової залози, а й бути непрямим свідком цитокиноподібної активності окремих доменів ферменту при патології.

Метою дослідження було порівняти рівні аутоантитіл проти ТирРС та її окремих доменів у сироватці крові пацієнтів з раком передміхурової залози та здорових донорів.

Матеріали і методи. Для отримання рекомбінантних білків повнорозмірної тирозил-тРНК синтетази та її окремих модулів *Bos taurus* використовували штамп-продуценти на основі реципієнта *Escherichia coli* BL21(DE3)pLysE. Штами *E.coli* трансформували за загальноприйнятою методикою [1] відповідними сконструйованими плазмідними векторами *pET30a-59K TyrRS*, *pET30a-39K TyrRS* та *pET30a-20K TyrRS*.

Рекомбінантні білки одержували із супернатантів лізованих клітин методом металхелатуючої хроматографії на Ni-NTA-агарозній колонці. Бактеріальні білки аналізували SDS-гель електрофорезом за Леммлі в денатуруючих умовах (12 % розділяючий гель), використовуючи суміш маркерних білків фірми "Fermentas" (Литва).

Рівень специфічних аутоантитіл досліджували методом твердофазного імуноферментного аналізу (ІФА) у сироватці крові 67 пацієнтів з раком передміхурової залози. Контролем слугувала сироватка крові 24 здорових донорів. Сироватка крові була люб'язно надана співробітниками ДУ "Інституту урології" НМАН України. В лунки планшета вносили по 1 мкг антигену, іммобілізували протягом 18 год за 4 °С у натрій-фосфатному буфері (0,75M NaCl, 0,025M Na₂HPO₄, pH 7,4). Потім планшети ретельно відмивали натрій-фосфатним буфером, що містив 0,1%-й твін-20, вільні сайти адсорбції блокували цим же буфером. Сироватку крові вносили в об'ємі 100 мкл у розведенні 1:50. Інкубували протягом

18 год при 4 °С. Далі планшети 10 разів відмивали натрій-фосфатним буфером з 0,1 %-м твін-20 та інкубували з антитілами проти IgG людини, кон'югованими з пероксидазою хрому ("Sigma", США). Після десятикратної відмивки реакцію візуалізували додаванням субстрату (0,05 мг/мл АВТS р 0,05 % H₂O₂ в 50 мМ цитрат-фосфатному буфері, pH 4,5-5,2). Оптичну густину визначали на рідері BioTek (BioTek Instruments, США) за довжини хвилі 405 нм.

Результати отриманні методом ІФА перевіряли у Вестерн-блот тесті. Суміш рекомбінантних білків тирозил-тРНК синтетази та її окремих доменів розділяли у препаративному SDS-гель електрофорезом за Леммлі в денатуруючих умовах (12 % розділяючий гель) та здійснювали напівсухий перенос на нітроцелюлозну мембрану (Amersham Bioscience, Німеччина). Мембрану розділяли на окремі смуги та інкубували у 5 % знежиреному сухому молоці у натрій-фосфатному буфері з додаванням 0,1 % твін-20 1 год. Смуги нітроцелюлози інкубували у сироватці кроля, імунізованого тирозил-тРНК синтетазою (1:75) та пацієнтів з раком передміхурової залози (1:200) 18 год при 4 °С. Після відмивки вносили вторинні антитіла кон'юговані з пероксидазою хрому. Реакцію візуалізували на ChemiDoc System (Bio-Rad Laboratories, США).

Статистичний аналіз даних здійснювали за допомогою програмного забезпечення STATISTICA 10.0. Непараметричні данні порівнювали у тесті Манна-Уїтні. Статистично значимою вважали різницю при $p < 0,05$.

Результати та їх обговорення. Для ідентифікації аутоантитіл проти тирозил-тРНК синтетази у крові людей нами було використано рекомбінантні тирозил-тРНК синтетазу та її окремі домени бичачого походження. Гомологія амінокислотних послідовностей тирозил-тРНК синтетаз достатньо висока для усіх еукаріотичних ферментів і становить більше 50 відсотків. При зіставленні амінокислотних послідовностей цитоплазматичних тРНК синтетаз людини та *B.taurus* показано, що ці послідовності мають однакову кількість амінокислотних залишків і відрізняються за 26 позиціями: їхня ідентичність становить 95%, а гомологія – 98%. Про ідентичність синтетаз також свідчить наявність імунологічного перехресту, визначеного при взаємодії обох синтетаз з моноклональними антитілами проти тирозил-тРНК синтетази *B. taurus* [37]. Необхідна чистота білків (більше 95%), що дозволяє судити про специфічність зв'язування з антитілами, була підтверджена у електрофорезі у денатуруючих умовах за Леммлі (дані не представлені).

Наявність аутоантитіл до рекомбінантних білків бичачої повнорозмірної тирозил-тРНК синтетази та її окремих доменів у зразках сироватки крові пацієнтів з раком передміхурової залози та здорових донорів визначали за допомогою твердофазного імуноферментного аналізу. Зразки сироватки з густиною оптичного поглинання більше за середнє значення плюс 2 стандартні відхилення (M+2SD) для донорських зразків вважали позитивними.

У контрольній групі не було виявлено серопозитивних зразків ні до повнорозмірної форми фермента, ні до її доменів. Натомість зразки з підвищеними рівнями аутоантитіл у пацієнтів з раком передміхурової залози були ідентифіковані до кожного з трьох білків. Максимальна аутореактивність була показана проти C-кінцевого домену. Рівень антитіл до домену був вищий від такого здорових донорів у 1,4 рази. Антитіло-позитивними до C-кінцевого домену виявились 46,3% пацієнтів з раком передміхурової залози. 29,8% пацієнтів мали підвищені рівні аутоантитіл до міні-ТирРС, і 38,8% особин з раком передміхурової залози були се-

ропозитивні до повнорозмірного ферменту. Підвищення рівнів аутоантитіл проти кожного з білків було статистично значиме з різним ступенем достовірності: проти ТирРС та С-кінцевого домену – $p < 0,001$, проти міні-ТирРС – $p < 0,01$.

Зразки сироваток найбільш або найменш реактивні до кожного з трьох білків за даними імуноферментного аналізу були перевірені методом імуноблотингу. Результати Вестерн-блот аналізу підтвердили дані отримані методом ІФА.

На сьогоднішній день існує значна кількість статей, що відзначають важливість дослідження аутоімунних процесів при раку передміхурової залози. Найбільш актуальним дане питання є у контексті пошуку нових маркерів онкопатології, оскільки ПСА при високій чутливості має низьку специфічність, наслідком чого є значна кількість хибно позитивних результатів. Сучасні тести для скринінгу раку передміхурової залози основані на виявленні PSA або PCA3 (Prostate Cancer Antigen – антиген раку передміхурової залози) [5]. Тому за допомогою тест-систем неможливо діагностувати онкопатологію на ранніх стадіях розвитку пухлини.

За отриманими нами даними, підвищення рівнів аутоантитіл до тирозил-тРНК синтетази та її окремих фрагментів у пацієнтів з раком передміхурової залози було статистично значимим для кожного з білків. Підвищену аутореактивність до ТирРС та С-кінцевого домену виявляли 38,8% та 46,3% пацієнтів з онкопатологією відповідно. Така кількість пацієнтів, що має підвищені рівні аутоантитіл до синтетази та її домену, вказує на перспективність білків як допоміжних маркерів при виявленні захворювання. X. Zhou з колегами провели протеомний скринінг білків, рівні яких найбільше відрізняються у сироватці крові пацієнтів з аденокарциномою легень та можуть слугувати неінвазивними маркерами захворювання. За результатами їх досліджень ТирРС є одним з трьох таких потенційних маркерів [32]. Робіт, які б досліджували аутоантитіла до тирозил-тРНК синтетази як маркери онкопатологій, на сьогодні немає. Натомість раніше нами було показано підвищення рівнів аутоантитіл до окремих доменів тирозил-тРНК синтетази при артеріальній гіпертензії [9], тому можливість використання аутоантитіл до ферменту та його окремих модулів у якості додаткових маркерів захворювання вимагає попереднього широкого скринінгу антитіл при різних патологіях.

У результаті гуморальної відповіді на канцерогенез утворюються антитіла до значної кількості внутрішньоклітинних молекул, які є потенційними маркерами захворювання та прогнозування перебігу захворювання, але вони несуть і фізіологічну функцію яка може як захищати організм від злоякісної трансформації, так і бути залученою до розвитку пухлини. Аутоантитіла, приєднуючись до антигена на поверхні клітини, можуть індукувати комплемент- або лейкоцит-залежну цитотоксичність [7], утворювати імунні

тирозил-тРНК синтетаз людини та *B.taurus* показано, що ці послідовності мають однаково кількість тирозилкомплекси, які потенційно мають реакцію запалення [10], просто приєднуючись до своїх антигенів, позбавляти їх можливості здійснити свої функції, або діяти як неімунні агоністи рецепторів. Усі ці властивості антитіл можуть бути використані як організмом, так і пухлиною, тому глибоке дослідження властивостей аутоантитіл при злоякісній трансформації може покращити наше розу-

міння патогенезу конкретного захворювання та стати основою для створення нових терапевтичних підходів.

Нами були виявлені антитіла як проти проангіогенного домену тирозил-тРНК синтетази – міні-ТирРС, так і проти С-кінцевого домену, спрямованість ангіогенних властивостей якого залежить від його концентрації [15]. Гетерогенність раку передміхурової залози значною мірою залежить від особливостей ангіогенезу. Створення мережі судин відіграє центральну роль в канцерогенезі, від нього залежить забезпечення пухлини поживними речовинами та її метастатичний потенціал [6]. Логічним є припустити, що підвищення рівнів аутоантитіл проти міні-ТирРС у пацієнтів з раком простати може сприяти нейтралізації розчинного антигену, знижуючи концентрацію проангіогенного білка у крові і сприяючи вповільненню пухлинного росту. Але при значній концентрації міні-ТирРС димеризується і виступає як нефункціональний агоніст рецептора хемокінів CXCR1/2 [26], що пов'язаний з клітинним ростом та ангіогенезом, блокуючи рецептор через який мономер міні-ТирРС запускає каскад, що призводить до судинної перебудови. Відтак аутоантитіла до міні-ТирРС можуть слугувати і на користь пухлини, сприяючи неоангіогенезу.

Ознаки хронічного запалення часто спостерігають у гістологічних зразках пацієнтів з раком передміхурової залози. Як вже було зазначено, вважається, що таке запалення сприяє прогресуванню захворювання та часто є причиною хибно позитивних тестів на ПСА [25], що ускладнює своєчасну постановку діагнозу. Запальні агенти при цьому залишаються нез'ясованими.

Обидва окремі домени тирозил-тРНК синтетази проявляють прозапальні властивості у той час як повнорозмірний фермент не несе цитокинових функцій. Це пояснюється особливостями структури білка. Ділянки послідовності, що відповідають за цитокинові властивості окремих доменів у нативній формі синтетази просторово недоступні. Мотив ELR на міні-ТирРС та гептапептид (Arg13-Thr19) на N-кінцевій частині ЕМАР II-подібного домену, які відповідають за цитокинові властивості, у молекулі повнорозмірної тирозил-тРНК синтетази просторово орієнтовані одна до одної, що робить кожну з послідовностей стерично недоступними [31]. За стресових умов, зокрема при запаленні, повнорозмірний фермент секретується з цитоплазми у зовнішню клітинний простір та може бути розщеплений протеазою на зразок лейкоцитарної еластази, при цьому сайти цитокинової активності стають доступні для взаємодії з відповідними рецепторами. Окрім того ділянки, що відповідають за цитокинову активність, можуть відкриватись при зв'язуванні ТирРС з відповідною тРНК [31], або при мутації ферменту Y341A [14]. Особливість просторової структури білка може пояснити той факт, що рівні аутоантитілів до окремого домену вищі за такі до повнорозмірного фермента. При протеолітичному розщепленні ТирРС відкриваються не тільки ділянки, що відповідають за цитокинову активність, а й нові потенційні антигенні детермінанти. Припущення, що фрагменти білкової послідовності, які у нормі є просторово недоступними, відкриваючись мають бути потужними антигенами, здається цілком логічним.

Оскільки за нашими результатами С-кінцевий домен синтетази викликав підвищення рівнів аутоантитіл більше за таке до повнорозмірного ферменту можна припустити що його імуногенність може пояснюватись саме доступністю нових, закритих у повнорозмірному ферменті, епітопів.

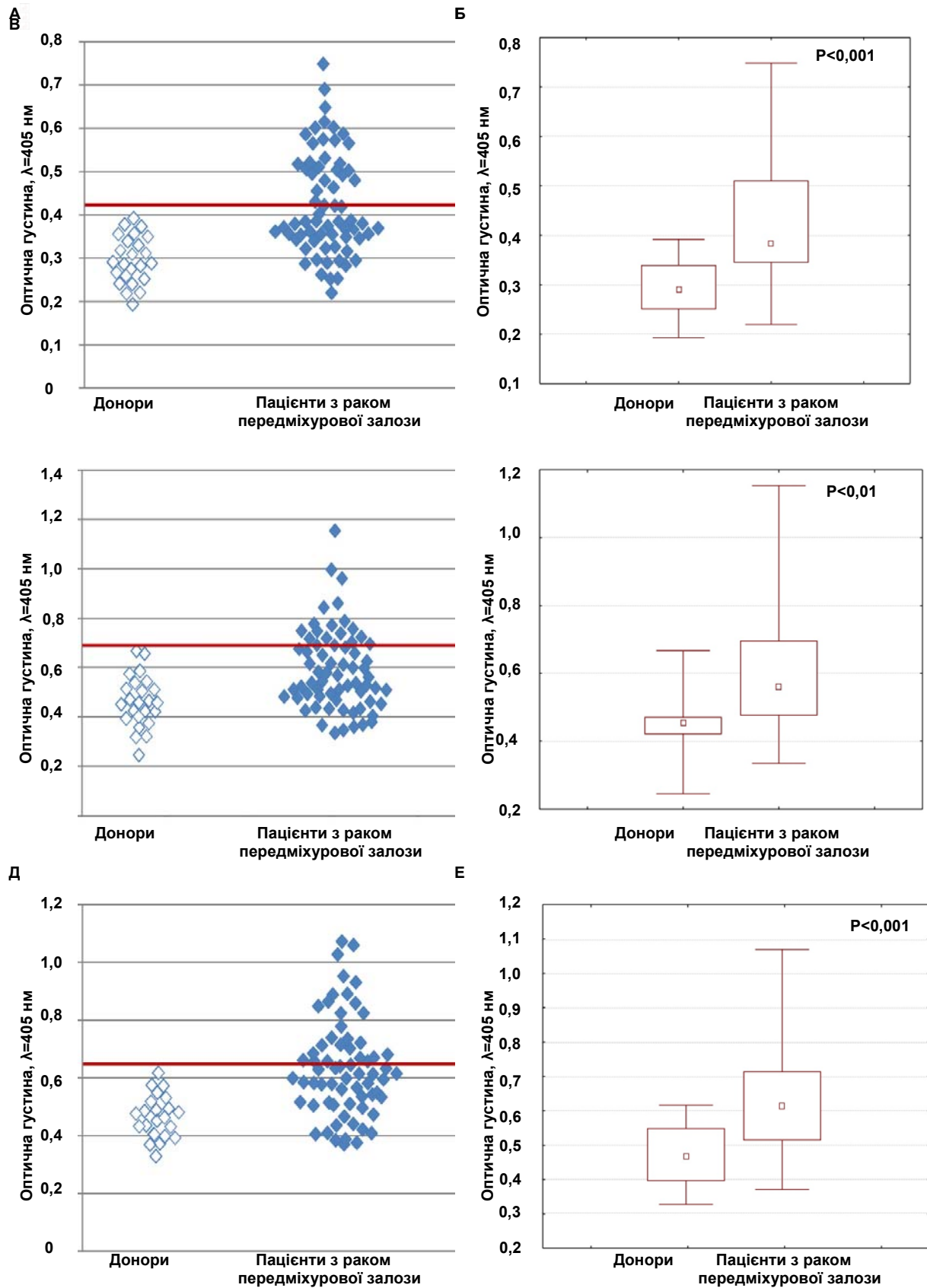


Рис. 1. Рівні аутоантител проти тирозил-тРНК синтетази (Д, Е), її N-кінцевого (В, Г) та С-кінцевого (А, Б) доменів у сироватці пацієнтів з раком передміхурової залози та здорових донорів. Маркерна лінія (А,В,Д) відділяє позитивні зразки сироватки та чисельно дорівнює середньому значенню плюс 2 стандартні відхилення відповідної донорської групи.

Квадратні графіки (Б,Г,Е) відображають середнє, максимальне та мінімальне значення, а також діапазон у якому знаходиться 50% значень для кожної вибірки. Статистичну значимість різниці між дослідною та контрольною групою визначали у тесті Манна-Уїтні

Аутоантитіла до окремих доменів ТирРС можуть нейтралізувати прозапальні цитокіни. Міні-ТирРС та С-кінцевий домен стимулюють запалення через клітини або гуморальні фактори неспецифічного імунітету, який вважається ефективним в елімінації пухлинних клітин на самих ранніх стадіях канцерогенезу, тоді як у подальшому запалення сприяє пухлинному росту. Відтак вплив аутоантитіл до фрагментів синтетази при злоякісній трансформації теоретично може виконувати захис-

ну функцію організму але таке припущення потребує значних практичних підтверджень. По-перше, аутоантитіла до окремих доменів можуть здійснювати і інші функції прозапальної спрямованості, по-друге, фактори імунної системи при канцерогенезі пов'язані у мережі складних взаємодій, що значно варіюють при різних патологіях та у різних пацієнтів, і наше розуміння таких зв'язків є досить обмеженим.

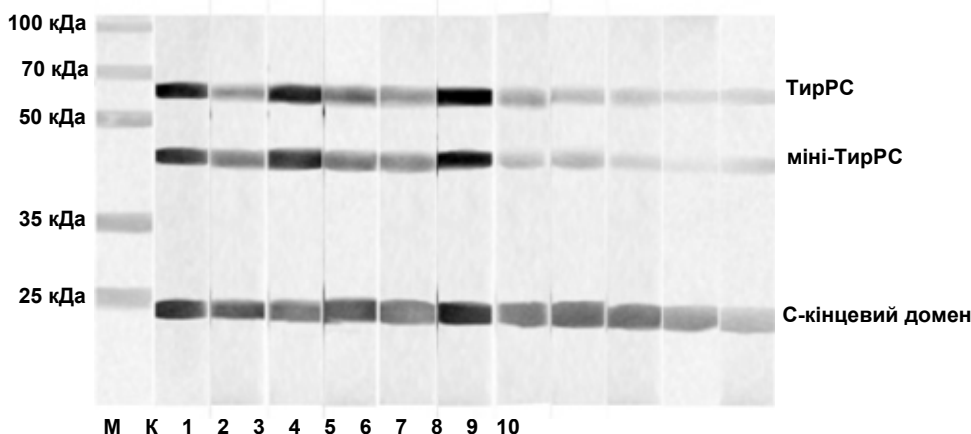


Рис. 2. Імунореактивність пацієнтів з раком передміхурової залози до тирозил-тРНК синтетази та її окремих доменів за результатами Вестерн блот аналізу. Смуги 1-5 інкубовані у сироватці пацієнтів з підвищеними рівнями аутоантитіл до синтетази та її окремих доменів, 6-10 – з більш низькими за результатами ІФА. К – контрольна смуга інкубована з сироваткою крові кролів імунізованих рекомбінантною повнорозмірною тирозил-тРНК синтетазою. М – маркерна суміш білків

Висновки. За умов необхідності створення комплексних тест-систем для виявлення раку передміхурової залози, аутоантитіла до тирозил-тРНК синтетази та її С-кінцевого домену є можливими додатковими антигенами серед панелі інших білків. Подальше вивчення значення впливу аутоантитіл до ферменту та його окремих модулів у взаємовідносинах організм-пухлина може значно поглибити наше уявлення про роль синтетази у канцерогенезі та сприяти персоналізації нових терапевтичних стратегій.

Список використаної літератури.

1. Кондратюк Ю. Ю. Виявлення аутоантитіл до тирозил-тРНК синтетази при серцевих дисфункціях / Ю. Ю. Кондратюк, Л. Л. Сидорик, В. І. Бобик, Д. В. Рябенко, А. І. Корнелюк // *Biopolym. Cell.* – 2010. – Том 26, № 2, С. 373-377.
2. Albertsen P. 20-year outcomes following conservative management of clinically localized prostate cancer / P. Albertsen, J. Hanley, J. Fine // *JAMA.* – 2005. – Vol. 293. – P. 2095-2101.
3. Belperio J. CXC chemokines in angiogenesis / J. Belperio, M. Keane, D. Arenberg [et al.] // *J Leukoc Biol.* – 2000. – Vol. 68, N 1. – P. 1-8.
4. Dean R. Macrophage-specific metalloelastase (MMP-12) truncates and inactivates ELR+ CXC chemokines and generates CCL2, -7, -8, and -13 antagonists: potential role of the macrophage in terminating polymorphonuclear leukocyte influx / R. Dean, J. Cox, C. Bellac // *Blood.* – 2008. – Vol. 112, N 8. – P. 3455-64.
5. Duffy M. PSA in screening for prostate cancer: more good than harm or more harm than good? / M. J. Duffy // *Advances in clinical chemistry.* – 2014. – Vol. 66. – P. 1-23.
6. Fukumura D. Tumor microvasculature and microenvironment: Targets for antiangiogenesis and normalization / D. Fukumura, R. Jain // *Microvasc Res.* – 2007. – Vol. 74. – P. 72-84.
7. Gehrs B. Autoimmune hemolytic anemia / B. Gehrs, R. Friedberg // *Am J Hematol.* – 2002. – Vol. 69, N 4. – P. 258-71.
8. Greenberg Y. The novel fragment of tyrosyl-tRNA synthetase, mini-TyrRS, is secreted to induce an angiogenic response in endothelial cells / Y. Greenberg, M. King, W.B. Kiosses [et al.] // *FASEB J.* – 2008. – Vol. 22(5):1597-605.
9. Grom M. Yu. Autoantibodies against tyrosyl-tRNA synthetase and its separated domains at essential hypertension / M. Yu. Grom, L. F. Yakovenko, V. M. Granich, A. S. Dobrohod, O. O. Torbas, G. D. Radchenko [et al.] // *Biopolym. Cell.* – 2015. – Vol. 31, N 4. – P. 255-263.
10. Gross W. Diagnosis and evaluation of vasculitis / W. Gross, A. Trabandt, E. Reinhold-Keller // *Rheumatology (Oxford).* – 2000. – Vol. 39, N 3. – P. 245-52.
11. Guo M. New functions of aminoacyl-tRNA synthetases beyond translation / M. Guo, X.-L. Yang, P. Schimmel // *Nat Rev Mol Cell Biol.* – 2010. – Vol. 11, N 9. – P. 668-74.
12. Howard O. Histidyl-tRNA synthetase and asparaginyl-tRNA synthetase, autoantigens in myositis, activate chemokine receptors on T lymphocytes and immature dendritic cells / O. Howard, H. Dong, D. Yang [et al.] // *J Exp Med.* – 2002. – Vol. 196, N 6. – P. 781-91.
13. Jura M. Comprehensive insight into human aminoacyl-tRNA synthetases as autoantigens in idiopathic inflammatory myopathies. M. Jura, L. Rychlewski, J. Barciszewski // *Crit Rev Immunol.* – 2007. – Vol. 27. – N 6. – P. 559-72.
14. Kim D. Association of Aminoacyl-tRNA Synthetases with Cancer / D. Kim, N. H. Kwon, and S. Kim // *Top Curr Chem.* – 2014. – Vol. 344. – P. 207-246.
15. Kornelyuk A. I. Cytokine activity of the non-catalytic EMAP-2-like domain of mammalian tyrosyl-tRNA synthetase / A. I. Kornelyuk, M. P. Tas, A. L. Dubrovsky, J. C. Murray // *Biopolym. Cell.* – 1999. – Vol. 15, N 2. – P. 168-72.
16. Kunst CB. Mutations in SOD1 associated with amyotrophic lateral sclerosis cause novel protein interactions / CB. Kunst, E. Mezey, MJ. Brownstein, D Patterson // *Nat Genet.* – 1997. – Vol. 15, N 1. – P. 91-4.
17. Mahler M. Idiopathic inflammatory myopathies and the anti-synthetase syndrome: a comprehensive review / M. Mahler, F. Miller, M. Fritzler // *Autoimmun Rev.* – 2014. – Vol. 13, N 4-5. – P. 367-71.
18. Mirande M. Aminoacyl-tRNA synthetase family from prokaryotes and eukaryotes: structural domains and their implications / M. Mirande // *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol.* – 1991. – Vol. 40. – P. 95-142.
19. Mucci L. Prospective Study of Prostate Tumor Angiogenesis and Cancer-Specific Morality in Health Professionals Follow-Up Study / L. Mucci, A. Powolny, E. Giovannucci, [et al.] // *J Clin Oncol.* – 2009. – Vol. 27. – P. 5627-5633.
20. Nangle L. Charcot-Marie-Tooth disease-associated mutant tRNA synthetases linked to altered dimer interface and neurite distribution defect / L. Nangle, W. Zhang, W. Xie, X.-L. Yang, P. Schimmel // *Proc Natl Acad Sci USA.* – 2007. – Vol. 104, N 27. – P. 11239-44.
21. Park SG. Aminoacyl tRNA synthetases and their connections to disease / SG. Park, P. Schimmel, S. Kim // *Proc Natl Acad Sci USA.* – 2008. – Vol. 105, N 32. – P. 11043-9.
22. Porter C. 25-year prostate cancer control and survival outcomes: A 40-year radical prostatectomy single institution series / C. Porter, K. Kodama, R. Gibbons, [et al.] // *J Urol.* – 2006. – Vol. 176. – P. 569-574.
23. Sampath P. Noncanonical function of glutamyl-prolyl-tRNA synthetase: genespecific silencing of translation / P. Sampath, B. Mazumder, V. Seshadri [et al.] // *Cell.* – 2004. – Vol. 119, N 2. – P. 195-208.

24. Schepers G. Mitochondrial aspartyl-tRNA synthetase deficiency causes leukoencephalopathy with brain stem and spinal cord involvement and lactate elevation / *GC. Schepers, T. van der Kloek, R. van Andel [et al.] // Nat Genet.* – 2007. – Vol. 39, N 4. – P. 534–9.
25. Schlick B. Serum Autoantibodies in Chronic Prostate Inflammation in Prostate Cancer Patients. *B. Schlick, P. Massoner, A. Lueking, [et al.] // PLoS ONE.* – 2016. – Vol. 11, N 2. DOI:10.1371/journal.pone.0147739.
26. Vo M. N., Dissociating quaternary structure regulates cell-signaling functions of a secreted human tRNA synthetase / *M. N. Vo, X.-L. Yang, P. Schimmel // J Biol Chem.* – 2011. – Vol. 286, N 13. – P. 11563–11568.
27. Wakasugi K. Two distinct cytokines released from a human aminoacyl-tRNA synthetase / *K. Wakasugi, P. Schimmel // Science.* – 1999. – Vol. 284, N 5411. – P. 147–51.
28. Wakasugi K. Highly differentiated motifs responsible for two cytokine activities of a split human tRNA synthetase / *K. Wakasugi, P. Schimmel // J Biol Chem.* – 1999. – Vol. 274, N 33. – P. 233–47.
29. Wakasugi K. Induction of angiogenesis by a fragment of human tyrosyl-tRNA synthetase / *K. Wakasugi, B. Slike, J. Hood [et al.] // J Biol Chem.* – 2002. – Vol. 277, N 23. – P. 20124–6.
30. Won Lee S. Multifunctional proteins in tumorigenesis: aminoacyl-tRNA synthetases and translational components / *S. Won Lee, Y. Sun Kang, S. Kim // Curr Proteomics.* – 2006. – Vol. 3, N 4. – P. 233–47.
31. Yang X.-L. Crystal structure of an EMAP-II-like cytokine released from a human tRNA synthetase / *X.-L. Yang, J. Liu, R. Skene, D. McRee, P. Schimmel // Helv Chim Acta.* – 2003. – Vol. 86, N 4. – P. 1246–57.
32. Zhou X. Proteomics-based identification of tumor relevant proteins in lung adenocarcinoma / *X. Zhou, L. Xue, L. Hao, S. Liu, F. Zhou, H. Xion [et al.] // Biomed Pharmacother.* – 2013. – Vol. 67, N 7. – P. 621–7.
33. Дубровський А. Л. Бактериальная экспрессия полноразмерных и усеченных форм цитокина EMAP-2 и цитокинподобного домена тирозил-тРНК синтетазы млекопитающих / *А. Л. Дубровський, Дж. Браун, А. И. Корнелюк, Дж. К. Мюррей, Г. Х. Мацука // Biopolym. Cell.* – 2000. – Том 16, № 3. – С. 229-235.
34. Корнелюк А. И. Тирозил – тРНК синтетазы из печени быка. Выделение и физико-химические свойства / *А. И. Корнелюк И. В. Курочкин, Г. Х. Мацука // Мол. биол.* – 1988. – Т. 22, № 1–С. 176-186.
35. Корнелюк А. И. Структурно-функциональное исследование тирозил-тРНК синтетазы млекопитающих / *А. И. Корнелюк // Biopolym. Cell.* – 1998. – Том – 14, № 4. – С. 349-359.
36. Леванец О. В. Гомология С-концевого некаталитического домена тирозил-тРНК синтетазы млекопитающих с цитокином EMAP II и некаталитическими доменами метионил- и фенилаланил-тРНК синтетаз / *О. В. Леванец, В. Г. Найденов, К. А. Одынец, [и др.] // Biopolym. Cell.* – 1997. – Том 13, № 6. – С. 474-478.
37. Рибкинська Т. А. Иммунохимический подход к изучению структуры тирозил-тРНК синтетазы из печени быка / *Т. А. Рибкинська, А. И. Корнелюк, А. И. Берестень, Г. Х. Мацука // Biopolym. Cell.* – 1991. – Том 7, № 5. – С. 33-36.
12. Howard OM, Dong HF, Yang D, Raben N, Nagaraju K, Rosen A, et al. Histidyl-tRNA synthetase and asparaginyl-tRNA synthetase, autoantigens in myositis, activate chemokine receptors on T lymphocytes and immature dendritic cells. *J Exp Med.* 2002;196(6):781–91.
13. Jura M, Rychlewski L, Barciszewski J. Comprehensive insight into human aminoacyl-tRNA synthetases as autoantigens in idiopathic inflammatory myopathies. *Crit Rev Immunol.* 2007;27(6):559–72.
14. Kim D, Kwon NH, Kim S. Association of Aminoacyl-tRNA Synthetases with Cancer *Top Curr Chem.* 2014;344:207–246.
15. Kornelyuk AI, Tas MPR, Dubrovsky AL, Murray JC. Cytokine activity of the non-catalytic EMAP-2-like domain of mammalian tyrosyl-tRNA synthetase. *Biopolym Cell.* 1999;15(2):168–72.
16. Kust CB, Mezey E, Brownstein MJ, Patterson D. Mutations in SOD1 associated with amyotrophic lateral sclerosis cause novel protein interactions. *Nat Genet.* 1997;15(1):91–4.
17. Mahler M, Miller FW, Fritzier MJ. Idiopathic inflammatory myopathies and the anti-synthetase syndrome: a comprehensive review. *Autoimmun Rev.* 2014;13(4–5):367–71.
18. Mirande M. Aminoacyl-tRNA synthetase family from prokaryotes and eukaryotes: structural domains and their implications. *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol.* 1991;40:95–142.
19. Mucci LA, Powolny A, Giovannucci E, Liao Z, Kenfield SA, Shen R, et al. Prospective Study of Prostate Tumor Angiogenesis and Cancer-Specific Mortality in Health Professionals Follow-Up Study. *StudyJ Clin Oncol.* 2009;27:5627-5633.
20. Nangle LA, Zhang W, Xie W, Yang XL, Schimmel P. Charcot-Marie-Tooth disease-associated mutant tRNA synthetases linked to altered dimer interface and neurite distribution defect. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2007;104(27):11239–44.
21. Park SG, Schimmel P, Kim S. Aminoacyl tRNA synthetases and their connections to disease. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2008;105(32):11043–9.
22. Porter CR, Kodama K, Gibbons RP, Correa RJr, Chun FK, Perrotte P, Karakiewicz PI. 25-year prostate cancer control and survival outcomes: A 40-year radical prostatectomy single institution series. *J Urol* 2006;176:569-574.
23. Sampath P, Mazumder B, Seshadri V, Gerber CA, Chavatte L, Kinter M, et al. Noncanonical function of glutamyl-prolyl-tRNA synthetase: genespecific silencing of translation. *Cell.* 2004;119(2):195–208.
24. Schepers GC, van der Kloek T, van Andel RJ, van Berkel CG, Sissler M, Smet J et al. Mitochondrial aspartyl-tRNA synthetase deficiency causes leukoencephalopathy with brain stem and spinal cord involvement and lactate elevation. *Nat Genet.* 2007;39(4):534–9.
25. Schlick B, Massoner P, Lueking A, Charoentong P, Blattner M, Schaefer G, et al. Serum Autoantibodies in Chronic Prostate Inflammation in Prostate Cancer Patients. *PLoS ONE.* 2016;11(2):e0147739.
26. Vo MN, Yang XL, Schimmel P. Dissociating quaternary structure regulates cell-signaling functions of a secreted human tRNA synthetase. *J Biol Chem.* 2006;286(13):11563–11568.
27. Wakasugi K, Schimmel P. Two distinct cytokines released from a human aminoacyl-tRNA synthetase. *Science.* 1999;284(5411):147–51.
28. Wakasugi K, Schimmel P. Highly differentiated motifs responsible for two cytokine activities of a split human tRNA synthetase. *J Biol Chem.* 1999;274(33):23155–9.
29. Wakasugi K, Slike BM, Hood J, Ewalt KL, Cheresh DA, Schimmel P. Induction of angiogenesis by a fragment of human tyrosyl-tRNA synthetase. *J Biol Chem.* 2002;277(23):20124–6.
30. Won Lee S, Sun Kang Y, Kim S. Multifunctional proteins in tumorigenesis: aminoacyl-tRNA synthetases and translational components. *Curr Proteomics.* 2006;3(4):233–47.
31. Yang X.-L., Liu J, Skene RJ, McRee DE, Schimmel P. Crystal structure of an EMAP-II-like cytokine released from a human tRNA synthetase. *Helv Chim Acta.* 2003;86(4):1246–57.
32. Zhou X, Xue L, Hao L., Liu S., Zhou F, Xion, et al Proteomics-based identification of tumor relevant proteins in lung adenocarcinoma. *Biomed Pharmacother.* 2013;67(7):621-7.
33. Дубровський А.Л., Браун Дж., Корнелюк А.И., Мюррей Дж.К., Мацука Г.Х. Бактериальная экспрессия полноразмерных и усеченных форм цитокина EMAP-2 и цитокинподобного домена тирозил-тРНК синтетазы млекопитающих. *Biopolym. Cell.* 2000; 16(3): 229-235.
34. Корнелюк А.И., Курочкин И.В., Мацука Г.Х. Тирозил – тРНК синтетазы из печени быка. Выделение и физико-химические свойства. *Мол. биол.* 1988; 22(1): 176-186.
35. Корнелюк А.И. Структурно-функциональное исследование тирозил-тРНК синтетазы млекопитающих. *Biopolym. Cell.* 1998; 14 (4): 349-359.
36. Леванец ОВ, Найденов ВГ, Одынец КА [и др.]. Гомология С-концевого некаталитического домена тирозил-тРНК синтетазы млекопитающих с цитокином EMAP II и некаталитическими доменами метионил- и фенилаланил-тРНК синтетаз. *Biopolym Cell.* 1997; 13(6): 474–8.
37. Рибкинська ТА, Корнелюк АИ, Берестень АИ, Мацука ГХ. Иммунохимический подход к изучению структуры тирозил-тРНК синтетазы из печени быка. *Biopolym. Cell.* 1991;7(5): 33–36.

М. Гром, асп.

Київський національний університет імені Тараса Шевченка, Київ, Україна,
Л. Яковенко, канд. биол. наук, Л. Сидорик, канд. биол. наук, О. Корнелюк, д-р биол. наук
Институт молекулярной биологии и генетики НАН Украины, Киев, Украина,
В. Григоренко, д-р мед. наук, М. Викарчук, врач
Институт урологии НАМН Украины, Киев, Украина

ТИРОЗИЛ-тРНК СИНТЕТАЗА И ЕЕ ОТДЕЛЬНЫЕ ДОМЕНЫ ВЕРОЯТНЫЕ АУТОИММУННЫЕ КОМПОНЕНТЫ ПАТОГЕНЕЗА РАКА ПРЕДСТАТЕЛЬНОЙ ЖЕЛЕЗЫ

Показано статистически значимое повышение уровней аутоантител к тирозил-тРНК синтетазе и ее отдельным доменам с просполительными и ангиогенными свойствами у пациентов с раком предстательной железы в сравнении с таким у клинически здоровых доноров. Максимальная аутоагрессия наблюдалась к С-концевому домену фермента, в то время как наиболее низкий уровень аутоантител к N-концевому модулю тирозил-тРНК синтетазы.

Ключевые слова: тирозил-тРНК синтетаза, аутоантитела, рак предстательной железы.

M. Grom, PhD Stud.

Taras Shevchenko National University of Kyiv, Kyiv, Ukraine, Kyiv, Ukraine,
L. Yakovenko, PhD., L. Sidorik, PhD., A. Kornelyuk, Doctor of Biological Sciences
Institute of Molecular Biology and Genetics NAS of Ukraine, Kyiv, Ukraine,
V. Grygorenko, Doctor of Medical Sciences, M. Vikarchuk, doctor
SI Institute of Urology NMAS of Ukraine, Kyiv, Ukraine

TYROSYL-tRNA SYNTHETASE AND ITS SEPARATED DOMAINS ARE SUPPOSITIONAL COMPONENTS OF PROSTATE CANCER PATHOGENESIS

Elevated levels of autoantibodies against tyrosyl-tRNA synthetase and its separated fragments enriched with proinflammatory and angiogenic properties in sera of patients with prostate cancer were shown. In serum samples of patients the highest levels of autoantibodies against C-terminal domain were observed. Minimal autoreactivity among persons with oncopathology was shown against N-terminal domain of tyrosyl-tRNA synthetase.

Key words: tyrosyl-tRNA synthetase, autoantibodies, prostate cancer.

УДК 577.112.7

А. Харькова, асп.,
Київський національний університет імені Тараса Шевченка, Київ, Київ,
О. Мінченко, проф.
Институт біохімії імені О.В. Палладіна, Київ

ЭКСПРЕСИЯ ГЕНОВ ПОДИБНЫХ ДО ИНСУЛИНУ ФАКТОРОВ РОСТУ ТА ЇХ РЕЦЕПТОРА У КЛІТИНАХ ГЛІОМИ З ПРИГНІЧЕНОЮ ФУНКЦІЄЮ ЕНЗИМУ ERN1 ЗА УМОВ ДЕФІЦИТУ ГЛЮКОЗИ

Встановлено, що за умов інгібування сенсорно-сигнального ензиму стресу ендоплазматичного ретикулу ERN1 у клітинах гліоми лінії U87 спостерігається зниження рівня експресії генів подібних до інсуліну факторів росту (IGF1 та IGF2), а також зростання експресії гена, що кодує IGF рецептор (IGF1R). За умов відсутності у поживному середовищі глюкози рівень експресії гена IGF1 знижується, а IGF2 та IGF1R – істотно не змінюється. Пригнічення функціональної активності ензиму ERN1 не впливає на чутливість експресії генів IGF1 та IGF1R до умов дефіциту глюкози у поживному середовищі, але інгібування ERN1 знімає ефект дефіциту глюкози на експресію гена IGF2. Таким чином, експресія генів IGF1, IGF2 та IGF1R, що задіяні у регуляції процесів проліферації клітин гліоми, є чутливою до умов дефіциту глюкози та залежить від функціональної активності ензиму ERN1.

Ключові слова: експресія генів, IGF1, IGF2, IGF1R, клітини гліоми, дефіцит глюкози, ERN1.

Вступ. Процеси проліферації, апоптозу та утворення пухлин тісно пов'язані з внутрішньоклітинними шляхами трансдукції сигналів, які є високо чутливими до впливу різноманітних сторонніх чинників. Зміна клітинного гомеостазу, концентрації йонів Ca^{2+} , нестача глюкози, амінокислот, дія хімічних токсинів, оксидативного стресу, гіпоксії, інгібіторів глікозилювання, тощо викликає в клітині комплекс реакцій відомих під загальною назвою стресу ендоплазматичного ретикулу (ЕР). Це є адаптивна реакція клітини на накопичення в люмені ЕР невірно згорнутих чи не згорнутих протеїнів внаслідок дії різноманітних зовнішніх чи внутрішніх стресових факторів [9].

Сигнальний шлях біфункціонального сенсорно-сигнального ензиму ERN1/IRE1 α (Endoplasmic Reticulum to Nuclei Signaling 1/Inositol Requiring Enzyme-1 α), який має серин-треонінкіназу та ендорибонуклеазу активності, являє собою найбільш універсальний та еволюційно консервативний механізм відповіді клітини на стрес ЕР. Ензим ERN1 залучений до початкових реакцій клітини на накопичення неправильно згорнутих протеїнів в ЕР як за фізіологічних, так і патологічних умов, зокрема в процесі розвитку злоякісних пухлин [7, 9]. Шаперони, що

за нормальних умов перебувають у комплексі з ERN1, при накопиченні неправильно згорнутих протеїнів у люмені ЕР дисоціюють. Це призводить до димеризації та аутофосфорилування ERN1, а також активації рибонуклеазного домену ERN1, який здійснює сплайсинг мРНК транскрипційного фактора XBP1 (X-box binding protein 1) та деградацію низки мРНК [1]. У результаті сплайсована форма мРНК транскрипційного фактора XBP1 транслюється з утворенням транскрипційного фактора, що регулює експресію великої групи генів, продукти яких відповідають за фолдинг протеїнів, виживання чи апоптоз клітини в залежності від інтенсивності і тривалості дії стресових чинників [9].

Апоптоз, індукований стресом ЕР, є важливим етапом у розвитку нейродегенеративних захворювань, атеросклерозу, ожиріння, різних форм діабету [14, 19]. З іншого боку, активація реакцій стресу ЕР у пухлинних клітинах, що характеризуються швидким поділом та підвищеним рівнем метаболічних процесів, доводить провідну роль реакцій стресу ЕР у регуляції проліферації та виживання пухлинних клітин [10]. Участь ERN1 у стресових реакціях клітини за умов пухлинного росту підтверджується тим фактом, що інгібування його акти-