

мом (ГКС) і 234 здорових індивідумів (контрольна група). Встановлено, що у хворих з ГКС співвідношення гомозигот F/F, гетерозигот і гомозигот f/f становить 27,1%, 51,7% і 21,2% (у контролі – 28,6%, 49,1% і 22,2%, $P=0,903$ за χ^2 -критерієм). У представників і жіночої, і чоловічої статі не виявлено статистично достовірного зв'язку між FokI поліморфізмом гена VDR і ГКС.

Ключові слова: рецептор вітаміну D, поліморфізм генів, гострий коронарний синдром.

Резюме

Гарбузова В.Ю. *Изучение частоты аллельных вариантов FokI полиморфизма гена рецептора витамина D у больных с острым коронарным синдромом.*

Представлены результаты определения FokI (rs2228570) полиморфизма гена рецептора витамина D (VDR) у 118 больных с острым коронарным синдромом (ОКС) и 234 здоровых индивидуумов (контрольная группа). Установлено, что у больных с ОКС соотношение гомозигот F/F, гетерозигот и гомозигот f/f составляет 27,1%, 51,7% и 21,2% (в контроле – 28,6%, 49,1% и 22,2%, $P=0,903$ по χ^2 -критерию). У лиц и женского, и мужского пола не выявлено статистически значимой связи между FokI полиморфизмом гена VDR и ОКС.

Ключевые слова: рецептор витамина D, полиморфизм генов, острый коронарный синдром.

Summary

Garbuzova V.Yu. *Study the frequency of allelic variants vitamin D receptor gene FokI polymorphism in acute coronary syndrome patients.*

FokI polymorphism (rs2228570) of vitamin D receptor (VDR) gene in 118 patients with acute coronary syndrome (ACS) and in 234 healthy people was determined. It was shown that in the patients with OCS distribution of F/F homozygotes, heterozygotes and f/f homozygotes was 27,1%, 51,7%, 21,2% (in control – 28,6%, 49,1%, 22,2%, $P=0,903$ by χ^2 -test). In the individuals both of female and male sex any statistically significant association between the FokI polymorphism of the VDR gene and ACS was not revealed.

Key words: vitamin D receptor, gene polymorphism, acute coronary syndrome.

Рецензент: д.біол.н., проф. С.В. Демідов

УДК:616-006.04:533.277.3

ЦИТОСТАТИЧНИЙ ВПЛИВ ПОХІДНОГО МАЛЕІМІДУ 1-(4-СІ-БЕНЗИЛ)-3-СІ-4-(СF₃-ФЕНІЛАМІНО)- 1Н-ПІРОЛ-2,5-ДІОНУ НА ПУХЛИННІ КЛІТИНИ ЕПІТЕЛІАЛЬНОГО ПОХОДЖЕННЯ

Л.В. Гарманчук, Є.О. Деніс, В.В. Нікуліна, О.І. Джус,
О.В. Скачкова, В.К. Рибальченко

*Київський національний університет імені Тараса Шевченка (Київ)
Національний інститут раку (Київ)*

Вступ

Процес зворотнього фосфорилування амінокислотних залишків – один із найпоширеніших механізмів регуляції активності білків. Під контролем даної регуляторної системи перебувають як ефекторні білки, так і численні ланки сигнальних каскадів. Тому протеїнкінази відіграють надзвичайно важливу роль у ключових процесах життєдіяльності клітини. Вони беруть участь у проведенні клітини фазами мітотичного циклу – відповідно визначаючи проліферативну активність, вмикають або вимикають метаболічні шляхи, контролюють входження клітини в апоптоз, або навпаки запуск програм виживання, визначають клітинну рухливість та взаємодії з локальним оточенням. Порушення регуляції вищезгаданих процесів може спричинити злоякісну трансформацію клітин. Багатьом лініям пухлинних клітин властива гіперактивність регуляторних протеїнкіназ функціонуючих у складі сигнальних каскадів, які сприяють входженню у мітоз. Особливо це стосується рецепторів з тирозинкіназою активністю – саме вони зазвичай фігурують як перший елемент передачі зовнішнього проліферативного сигналу, і їх неадекватна активність сприяє прогресивному наростанню концентрації вторинних месенджерів та ендогенних індукторів клітинної проліферації, що ефективно спрямовують клітину на входження в мітоз [6, 7, 15].

З того часу як було встановлено значення порушень активності протеїнкіназ для клітин злоякісних новоутворень триває розробка різноманітних специфічних інгібіторів цих ферментів. Велика кількість такого роду речовин уже застосовуються як дієві проти-

Екологічні аспекти сучасної біології та медичної генетики

пухлинні препарати. Цінною терапевтичною властивістю даної категорії лікарських речовин є те, що вони виступають саме як цитостатики, покликані пригнічувати клітинний поділ, у той час як переважна більшість класичних агентів залучених до хіміотерапії новоутворень є антиметаболітами з вираженою цитотоксичністю не лише до злоякісно трансформованих клітин, а й до нормальних клітин організму. Окрім того, перспективною властивістю інгібіторів протеїнкіназ як ліків слід вважати високу специфічність [13]. За допомогою сучасних методів дизайну *in silico* реально розробляти сайт-специфічні молекули-інгібітори до певних груп ферментів. На такому підході базується таргетна терапія онкологічних захворювань – суворо направлена на окрему молекулярну мішень. Її мета – корекція патологічної ланки у порушеному сигнальному каскаді при максимальній недоторканності інших життєво-важливих систем. Особливо актуальним подібний підхід виглядає на тлі різноманіття молекулярних механізмів, порушення яких виливається в онкологічну патологію. Таргетна терапія – рішучий крок у напрямку індивідуалізації медицини [15, 16].

Завдяки певним особливостям хімічної будови малеїмід розглядається як перспективний попередник речовин-цитостатиків. На кінець XX століття уже були відомі деякі деривати малеїмиду з характерною антипроліферативною активністю (біс-індолілмалеїмід, азаіндолілмалеїмід, ариліндолмалеїмід) [8]. Після етапу розробки *in silico*, науково-виробничим хіміко-біологічним центром Київського національного університету імені Тараса Шевченка синтезовано похідне малеїмиду – 1-(4-Cl-бензил)-3-Cl-4-(CF₃-феніламіно)-1H-пірол-2,5-діон (надалі МП1) [14]. При розгляді молекулярного дизайну даної речовини передбачалось, що її просторова конфігурація відповідатиме АТФ-зв'язуючому сайту на молекулах протеїнкіназ. Володіючи конформацією подібною до молекули АТФ, але не містячи відповідних точок гідролізу МП1 може виступати конкурентним інгібітором протеїнкіназ. Біохімічними дослідженнями було доведено його здатність інгібувати ферменти класу протеїнкіназ, зокрема особливо виражений пригнічуючий ефект що до рецепторних тирозинкіназ [9, 14]. У випробуваннях на культурах трансформованих та пухлинних клітин було відмічено сильний цитостатичний вплив на клітинні лінії епітеліального походження, та досить помірний рівень цитотоксичності [3, 5]. У дослідях на

тваринах також відмічалася низька токсичність препарату по відношенню до органів травної, та статеві систем [1, 2, 11]. В той же час МП1 достовірно пригнічує розвиток колоректальних пухлин індукованих у щурів диметилгідразином, як при профілактичному так і при лікувальному застосуванні [10].

Зважаючи на велику кількість сприятливих даних стосовно речовини МП1 **метою** даного дослідження було визначення її ефектів на проліферативну активність, життєздатність та перебіг клітинного циклу в трансформованих клітинах епітеліального походження.

Матеріали та методи дослідження

Для визначення цитотоксичного/цитостатичного впливу МП1 було використано клітинні лінії людини епітеліального походження: COLO 205 - аденокарцинома товстого кишечника, MCF-7-рак молочної залози, Hela- рак шийки матки. Клітинні лінії були люб'язно надані д-ром Лондонського університету Гутом І.Т.

Тестування цитотоксичної/цитостатичної дії МП1 на різні типи культивованих клітин проводили протягом доби з препаратом за стандартних умов. Для цього клітини висаджували в 96-лункові планшети в концентрації від 5×10^4 клітин/мл в об'ємі 100 мкл повного середовища DMEM (Sigma, США), що містило 10% ЕТС (Sigma, США), 2 мМ L-глутаміна (Sigma, США) і 40 мкг/мл гентаміцину (Біофарма, Україна) та інкубували протягом 4 годин за стандартних умов: 5% CO₂, 100% вологість, 37°C. Після адаптації клітин до середовища культивування додавали МП1 (в 100 мкл культурального середовища) в широкому діапазоні концентрацій та інкубували за тих же умов протягом доби. Через 24 години визначали кількість живих клітин в лунках за допомогою МТТ-тесту [4]. Цитотоксичну дію тест-агенту для кожної концентрації оцінювали по виживаності клітин (в % по відношенню до контролю) та характеризували показником IC₅₀ (концентрація тест-агенту, що обумовлює зменшення кількості живих клітин на 50% в порівнянні до контролю).

Для визначення розподілу клітин за фазами циклу використовували метод протокової цитофлуориметрії [12]. Для цього клітини висаджували в 6-лункові планшети в концентрації 5×10^4 /мл в об'ємі 5 мл повного культурального середовища та інкубували з МП1 в концентраціях, які були в 10 разів меншими за показник IC₅₀, визначений в МТТ-тесті для кожної клітинної лінії. Інкубації за цих умов тривала 48 годин. Після зафарбовування за стандартною

методикою проводили визначення кількості клітин в різних фазах клітинного циклу з використанням обладнаного аргонним лазером ($\lambda_{\text{збуд}}=488 \text{ нм}$, $\lambda_{\text{еміс}}=585/40 \text{ нм}$) протокового цитофлуориметра (Becton Dickinson, США). Проби аналізували із застосуванням програми Mod Fit LT 3.0 (BDIS, USA).

Отримані результати та їх обговорення

За результатами цитостатичного/цитотоксичного скринінгу було виявлено, що найбільш чутливими до дії малеїміду були клітини раку молочної залози MCF-7, за що свідчить показник IC_{50} рівний $0,21 \text{ мМ}$ (рис. 1 Б), тоді як аналогічні показники для клітин Hela та Colo 205 рівні $0,43$ та $0,63 \text{ мМ}$, відповідно (рис. 1 А та В).

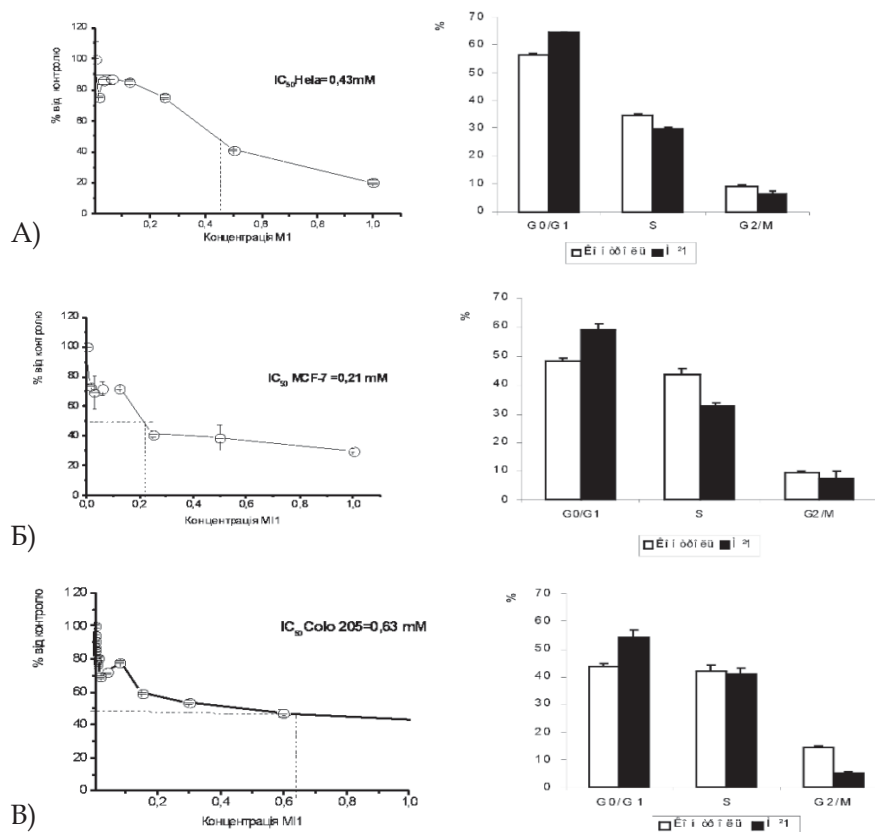


Рис.1. Цитотоксичний/цитостатичний скринінг М1 по відношенню до клітин Hela (А), MCF-7 (Б), Colo 205(В): дані МТТ-тесту та цитофлуориметричного аналізу.

Так як, за даними літератури відомо про помірний цитотоксичний вплив М1 по відношенню до ряду культивованих клітин *in vitro* та в дослідженнях гострої цитотоксичності *in vivo* нами було перевірено його антипроліферативну дію. Для цього, кожен із клітинних ліній інкубували в концентраціях М1, що були меншими від показника IC_{50} в 10 разів, що становило для клітин лінії Hela – $0,04 \text{ мМ}$, MCF-7 – $0,02 \text{ мМ}$ та Colo 205 – $0,06 \text{ мМ}$, відповідно. За підрахунком співвідношення живих : мертвих клітин було виявлено, що за даних умов інкубації найчутливішими до цитотоксичного впливу були клітини Colo 205, відсоток мертвих для яких становив $17 \pm 1,5\%$ (табл.1), тоді як клітини Hela та MCF-7 характеризувались майже 90% виживаністю та не відрізнялись від такої в контролі.

Таблиця 1

Виживаність клітин за дії малеїміду

% клітин	Hela	MCF-7	Colo 205
Контроль			
живі	$92,9 \pm 3,2$	$94,5 \pm 3,9$	$93,6 \pm 0,9$
мертві	$8,5 \pm 2,5$	$6,9 \pm 3,2$	$5,8 \pm 3,2$
М1			
живі	$89,5 \pm 2,5$	$90,2 \pm 3,7$	$82,8 \pm 5,4$
мертві	$12,6 \pm 3,8$	$11,4 \pm 1,9$	$17 \pm 1,5^*$

Отже, як свідчать наведені дані лише клітини Colo 205 були найбільш чутливими до цитотоксичного впливу в субтоксичному діапазоні концентрацій М1.

Щодо антипроліферативного ефекту, то для всіх трьох досліджуваних пухлинних клітин епітеліального походження виявлено значне зменшення субпопуляції клітин проліферативного пулу (рис. 1). Так, популяція клітин в $G_2/M+S$ для Hela становила $45,6 \pm 2,5\%$ в контролі та $35,4 \pm 0,6\%$ за дії малеїміду; для MCF-7 – $52,4 \pm 0,7\%$ в контролі та $39,4 \pm 0,7\%$ під впливом М1; для клітин Colo 205 – $56,7 \pm 0,9\%$ в контролі та $45,4 \pm 0,8\%$ за впливу малеїміду. Відповідно за культивування з М1 для всіх досліджуваних варіантів клітин наростала субпопуляція клітин G_1/G_0 , що свідчить про виражений цитостатичний вплив досліджуваної сполуки. Так як, за попередніми даними відомо, що М1 є інгібітором тирозинкіназ то, певно, отриманий нами антипроліферативний цитостатичний ефект, якраз і пов'язаний з залученням цих механізмів.

Висновки

1. Виявлено, що похідне малеїміду (1-(4-Cl-бензил)-3-Cl-4-(CF₃-феніламіно)-1H-пірол-2,5-діон) проявляє помірний цитотоксичний вплив на пухлинні клітини епітеліального походження, що характеризується показником IC₅₀ для Hela - 0,43 мМ, для MCF-7 - 0,21 мМ, для Colo - 0,63 мМ.

2. При культивуванні клітин в субтоксичному діапазоні МП1 (IC₅₀) їх виживаність не відрізнялась від контрольних показників для клітин Hela та MCF-7 і була дещо нижчою для клітин Colo 205 порівняно з відповідним контролем (82,8 ± 5,4% проти 93,6 ± 0,9%).

3. За даними цитофлуориметричного аналізу під впливом МП1 наростала субпопуляція клітин G₁/G₀ фази в середньому 1,2 - 1,3 рази

Література

1. Морфо-функціональний стан органів шлунково-кишкового тракту після впливу похідного малеїміду МП1 протягом місяця / О.В. Линчак, І.В. Харчук, Н.О. Карпезо [та ін.] // Сучасні проблеми токсикології. - 2011. - Т. 1-2 (52). - С. 52-55.

2. Морфо-функціональні зміни в сім'яниках щурів під впливом нового антинеопластичного препарату, похідного малеїміду / І.В. Харчук, Н.О. Карпезо, Г.В. Островська [та ін.] // Сучасні проблеми токсикології. - 2008. - Т. 1. - С. 61-64.

3. Цитостатична дія похідних малеїміду на клітинах лінії HEK293 / Г.В. Островська, К.О. Ніжерадзе, Г.Г. Дубініна, В.К. Рибальченко // 2-й з'їзд Українського товариства клітинної біології: збірник тез (23-26 жовтня 2007 р.). - Київ, 2007. - С. 126.

4. Alley M.C. Feasibility of drug screening with panels of human tumor cell lines using a microculture tetrazolium assay / M.C. Alley, D.A. Scudiero, P.A. Monks [e. a.] // Cancer Research - 1988. - Vol. 48. - P.589-601.

5. Antiproliferative properties and low hepatotoxicity of new cytostatic maleimide derivative / S. Yablonska, O. Filinska, G. Ostrovska [e. a.] // Biochemistry of cell regulation: 33-rd FEBS Congress and 11th IUBMB Conference. - Athens, Greece, 2008. - P. 348.

6. Blume-Jensen P. Oncogenic kinase signalling / P. Blume-Jensen, T. Hunter // Nature. - 2001. - Vol. 411. - P. 355-365.

7. Hanahan D. Hallmarks of cancer: the next generation / D. Hanahan, R. Weinberg // Cell. - 2011. - Vol. 144. - P. 646-688.

8. Hers I. The protein kinase C inhibitors bisindolylmaleimide I (GF 109203X) and IX (Ro31-8220) are potent inhibitors of glycogen kinase-3 activity / I. Hers. // FEBS Lett. - 1999. - Vol. 460. - P. 433-436.

9. Jaye M.C. Discovery of substituted maleimides as liver X receptor agonists and determination of a ligand-bound crystal structure / M.C. Jaye, J.A. Crawiek, N. Campobasso // J. Med. Chem. - 2005. - Vol. 48. - P. 5419-5422.

10. Lynchak O. Effects of new maleimide derivative on the 1,2-dimethylhydrazine-induced colon carcinogenesis in rats / O. Lynchak, G. Ostrovska, V. Rybalchenko // Gut "GASTRO 2009 UEGW/WCOG, London". - 2009. - Vol. 58 (Suppl. II). - P. 334.

11. Lynchak O. State of colon mucosal under the effects of new protein-tyrosine kinases inhibitor maleimide derivative / O. Lynchak, G. Ostrovska, A. Burlaka [et. al.] // Gut "GASTRO 2010 - 18th UEGW Barcelona". - 2010. - Vol. 58. - P. 133.

12. Nicoletti I. A rapid and simple method for measuring thymocyte apoptosis by propidium iodide staining and flow cytometry / I. Nicoletti, G. Migliorati, M.C. Pagliacci [e. a.] // J. Immunol. Methods. - 1991. - Vol. 139. - P. 271-280.

13. Novak K. Conference Report - Protein Kinase Inhibitors in Cancer Treatment: Mixing and Matching? / K. Novak // Med. Gen. Med. - 2004. - Vol. 6, № 2. - P. 25.

14. Pat. 22204 (UA). Compound of 1,4-disubstituted 5-amino-1,2-dihydropyrrrole-3-one having anticancer activity / G.G. Dubinina, Yu.M. Volovenko; 21.02.2006. Appl. U200601855; 25.04.2007.

15. Perona R. Cell signalling: growth factors and tyrosine kinase receptors / R. Perona // Clin. Transl. Oncol. - 2006. - Vol. 8 (2). - P. 77-82.

16. Takeuchi K. Receptor tyrosine kinases and targeted cancer therapeutics / K. Takeuchi, F. Ito // Biol. Pharm. Bull. - 2011. - Vol. 34 (12). - P. 1774-1780.

Резюме

Гарманчук Л.В., Деніс Є.О., Нікуліна В.В., Джус О.І., Скачкова О.В., Рибальченко В.К. Цитостатичний вплив похідного малеїміду 1-(4-Cl-бензил)-3-Cl-4-(CF₃-феніламіно)-1H-пірол-2,5-діону на пухлинні клітини епітеліального походження.

В результаті проведеного дослідження була показана цитостатична та антипроліферативна дія похідного малеїміду (1-(4-Cl-бензил)-3-Cl-4-(CF₃-феніламіно)-1H-пірол-2,5-діон) по відношенню до клітинних ліній епітеліального походження COLO 205, MCF-7 та Hela. Так, кількість клітин в G₂/M+S фазах клітинного циклу зменшувалась приблизно у 1,2 - 1,3 рази для всіх клітинних ліній за впливу малеїміду порівняно з контролем. Отже, малеїмід є перспективною речовиною для терапії новоутворень епітеліального походження та потребує подальшого дослідження.

Ключові слова: похідні малеїміду, пухлинні клітини епітеліального походження, цитостатична та антипроліферативна дія.

Резюме

Гарманчук Л.В., Деніс Е.О., Никулина В.В., Джус Е.И., Скачкова О.В., Рыбальченко В.К. Цитостатическое влияние производного малеимида 1-(4-Cl-бензил)-3-Cl-4-(CF₃-фениламино)-1H-пирол-2,5-диона на опухолевые клетки эпителиального происхождения.

В результате проведенного исследования было показано цитостатическое и антипролиферативное действие малеимида (1-(4-Cl-бензил)-3-Cl-4-(CF₃-фениламино)-1H-пирол-2,5-дион) на клеточные линии эпителиального происхождения COLO 205, MCF-7 и Hela. Так, количество клеток в G2/M+S фазах клеточного цикла уменьшалось в 1,2 - 1,3 раза для всех линий, по сравнению с контролем. Поэтому, производное малеимида можно считать перспективным соединением для терапии злокачественных новообразований, что требует дальнейших исследований.

Ключевые слова: производные малеимида, опухолевые клетки эпителиального происхождения, цитостатическое и антипролиферативное действие.

Summary

Garmanchuk L.V., Denis E.V., Nikulina V.V., Dzhus O.I., Skachkova O.V., Ridalchenko V.K. *Citostatic influence the derivate of maleimide - 1-(4-Cl-benzyl)-3-Cl-4-(CF₃-phenilamino)-1H-pirol-2,5-dion on the epithelial tumor cell lines.*

Hence, we have shown cytostatic and antiproliferative effect the derivate of maleimide - 1-(4-Cl-benzyl)-3-Cl-4-(CF₃-phenilamino)-1H-pirol-2,5-dion on epithelial cell lines COLO 205, MCF-7 and Hela. The amount of cells in G2/M+S phases of cell cycle have been decreased in 1,2 - 1,3 times in for all lines in the presence of MI1 against the control. Therefore, maleimid is perspective drug for antitumor therapy and worth of furthermore detailed study.

Key words: the derivate of maleimide, the epithelial tumor cell lines, cytostatic and antiproliferative effect.

Рецензент: д.біол.н., проф. С.М.Смірнов

УДК 581.8:582.894.6

АНАТОМІЧНЕ ВИВЧЕННЯ ЛИСТЯ CORNUS MAS I CORNUS OFFICINALIS

О.В. Криворучко, О.В. Гамуля, В.М. Ковальов
Національний фармацевтичний університет (Харків)

Вступ

Рід дерен або кизил (*Cornus L.*) відноситься до родини деренові (*Cornaceae (Dumort) Dumort.*). У Дендрофлорі України [2] описано 18 видів дерену. Для нас представляють інтерес дерен справжній та дерен лікарський.

Дерен справжній (*Cornus mas L.*) – невелике листопадне дерево або кущ 2-9 м заввишки, зі стовбуром 25-45 см у діаметрі, з дуже твердою деревиною і темно-коричневою потрісканою корою, що відшаровується. Молоді пагони зелені, коротковолосисті, річні й старіші – від жовтувато-сірих до червонувато-бурих, майже голі. Листорозташування супротивне, листки прості, на коротких, 5-10 мм завдовжки, притиснуто-волосистих черешках, ясно- чи сизо-зелені, знизу забарвлені блідіше, з обох боків усажені притиснутими двороздільними щетинками, знизу, крім того, з простими кучерявими білими волосками, що утворюють борідки в пазухах вторинних жилок, до 11 см завдовжки і 5 см завширшки, від яйцеподібних і яйцеподібно-еліптичних до ланцетоподібних і вузькоеліптичних, з гострою або довгозагостреною верхівкою і з округлою або клиноподібною основою, з 3-6 вторинними бічними жилками і з добре помітною з обох боків сіткою дрібних жилок. Квітки розпускаються раніше за листя; квітконосні пагони 5-8 мм завдовжки. Чашолистки обгортки жовтувато-зелені, 5-12 мм завдовжки, 3-6 мм завширшки; зовні сіруваті від густого опушення з притиснутих двороздільних волосків, по краю і на кінчику біловолохато-повстяні, яйцеподібні, тупі або загострені, з коротким, стягуючим кінчиком, вістрям. Квітки в суцвітті у кількості 15-25, на густоопушених квітконіжках 4-9 мм завдовжки. Зав'язь оберненоконічна, густо притиснуто-волосиста, 0,75-1 мм завдовжки. Зубці чашечки трикутні, за розміром подібні диску або трохи перевищують його. Пелюстки ланцетно-трикутні, загострені, після відцвітання відігнуті до низу, 2-2,5 мм