

KOMISSAROVA S.M.¹, CHAKOVA N.N.², KRUPNOVA E.V.², MICHALENKO E.P.²,
CHEBOTARYOVA N.V.², NIYAZOVA S.S.²

¹ The Republican and Practical Centre «Cardiology»

² Genetics and Cytology Institute of the National Academy of Sciences of Belarus, Minsk
Belarus, 220036, Minsk, R. Luxemburg str., 110, e-mail: kom_svet@mail.ru

INDIVIDUALIZATION OF ANGIOTENSIN II BETA-BLOCKER TREATMENT IN PATIENTS WITH HYPERTROPHIC CARDIOMYOPATHY

Aims. To assess the influence of gene polymorphism, coding RAAS proteins (I/D gene polymorphism ACE and A1188C gene polymorphism AGTR1) on the effectiveness and safety of ARB therapy (losartan) in patients with HCM. **Methods.** The study comprised 73 patients with HCM (54 males and 19 females, mean age 46,7±15,7 yrs.). All patients received losartan during 12 months. All patients showed I/D- polymorphism in ACE gene and change in A1166C of gene AGTR1 using PCR-RFLP analysis. **Results.** Losartan therapy improved hemodynamic state in HCM patients, but was unevenly effective in respect of left ventricular hypertrophy regression (LVH). The greatest positive effect of treatment was noted in most of the patients (87,5 %) that were the carriers of heterozygous genotype combination AC(AGTR1)/ID(ACE) and in 58,3 % of carriers of homozygous genotypes AA(AGTR1)/DD(ACE). In subjects with genotype combination of AA(AGTR1)/II ACE a resistant LVH was discovered in 87,5 % of cases. **Conclusion.** Prior to losartan therapy, it is reasonable to perform genotyping of RAAS proteins (I/D gene polymorphism ACE and A1188C gene polymorphism AGTR1), which allows considering genetic factors susceptible to the drug administered.

Key words: hypertrophic cardiomyopathy, AGTR1 and ACE gene polymorphism, angiotensin II beta-blocker.

КУШНІРУК В.О., РУБАН Т.П., ЛУКАШ Л.Л.

Інститут молекулярної біології і генетики НАН

України, Київ, 03143, вул. Акад. Заболотного, 150, e-mail: kushniruk_v_o@ukr.net

МОРФОЛОГІЧНІ ТА РОСТОВІ ОСОБЛИВОСТІ НОВОЇ ЛІНІЇ КЛІТИН ЛЮДИНИ 4BL

Клітинні лінії різного походження активно використовуються у фундаментальних дослідженнях, для цілей клітинної терапії [1, 2], промислової біотехнології, розробки та тестування лікарських препаратів, в експериментальній онкології тощо [3]. Переважна кількість постійних ліній клітин людини мають пухлинне походження, є злоякісними і характеризуються значними змінами каріотипу і порушеннями регуляції роботи мітотичного апарату. Значна частина постійних ліній клітин людини отримана або з тканин ембріонального походження, або їхня іморталізація здійснювалася шляхом вірусної трансформації чи за допомогою введення векторних конструкцій з певними генами [3]. Тому оригінальна клітинна лінія 4BL, отримана із периферійної крові здорового донора у відділі генетики людини, викликає особливий інтерес. Клітинна лінія 4BL успішно пододала ліміт Хейфліка та культивується вже понад 220 пасажів. За час культивування не помічали ознак клітинного старіння, кризи та зміни морфології,

що дає підстави вважати її потенційно іморталізованою.

Морфологія клітин є однією з ключових характеристик клітинної лінії, оскільки свідчить про належність клітин до того чи іншого типу, оцінка морфології клітин дає змогу оцінити їхній стан, запідозрити наявність контамінації, визначити потребу в пересіві і т.д. Криві росту, як і морфологія клітин, є важливою характеристикою клітинної лінії, знання її кінетичних параметрів суттєво допомагає досліднику при плануванні експериментів. На різних стадіях росту, що описуються відповідною кривою, клітини значно відрізняються між собою за властивостями. Аналіз кривих росту дозволяє визначити оптимальне розведення при посіві та термін для зміни середовища і субкультивування, для введення речовин, що тестується, та накопичення потрібного продукту тощо. Таким чином, метою роботи було дослідити морфологічні та ростові особливості нової лінії клітин людини 4BL.

Матеріали та методи

У роботі використовували клітинні популяції нової лінії клітин 4BL, яка отримана із периферійної крові здорового донора, та її клони – C11, C12 та C13. Початково клітини вирощували на фідері мітотично інактивованих фібробластів людини, оброблених мітоміцином С в концентрації 10–20 мкг/мл, та культивували з додаванням цитокінів LIF, SCF і IL-3 по 2 нг/мл кожного і 30 % середовища, кондиційованого ембріональними гермінативними клітинами людини [4]. Згодом відбирали клони клітин, які швидко росли та культивували їх як моношарову культуру у стандартному середовищі DMEM («Sigma», США) із додаванням 100 ОД/мл пеніциліну, 100 мкг/мл стрептоміцину, та 10 % ембріональної сироватки теляти.

Також досліджували динаміку змін каріотипу клітинної лінії 4BL6 при тривалому культивуванні [5].

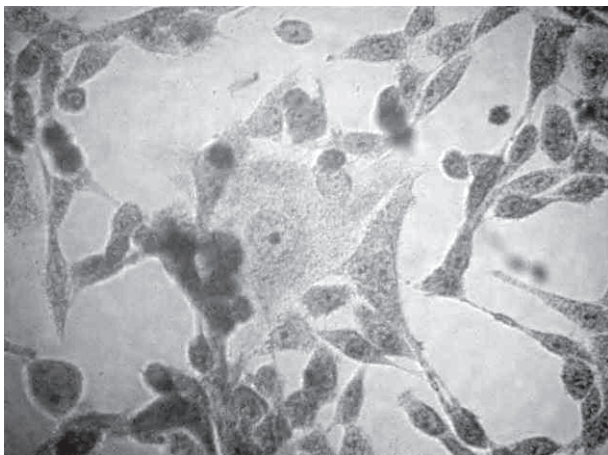
Результати та обговорення

У клітинній лінії 4BL найбільш виражені два морфологічні типи клітин: витягнуті фібробластоподібні та подібні до трикутника або більш розпластані епітеліоподібні клітини (рис. 1), з невисокою частотою зустрічаються круглі клітини, які відкріплюються від поверхні та пе-

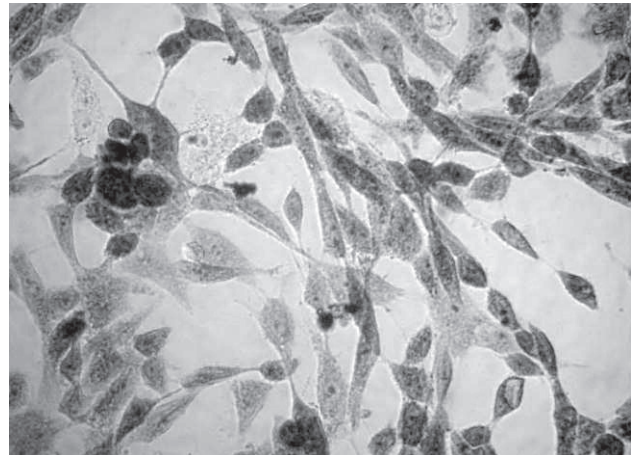
Для морфологічних досліджень клітини вирощували на малих чашках Петрі (d=3 см), при досягненні субконфлуентного (subconfluent) моношару середовище відбирали, клітини промивали двічі-тричі PBS та забарвлювали 1 % розчином нейтрального червоного та фотографували на мікроскопі Primo Star «Carl Zeiss» за допомогою програми Axio Vision.

Для аналізу ростових властивостей клітини розсівали на 10 флаконів (об'ємом 10 мл) по 100 тис. клітин на флакон і додавали по 3 мл ростового середовища. Далі через кожні 24 год клітини знімали з поверхні культурального посуду за допомогою суміші розчинів 0,25 % трипсину та 0,02 % ЕДТА (1:3), підраховували їхню кількість у лічильній камері Горяєва і визначали загальну кількість клітин в культуральному флаконі. При закисленні середовища його змінювали на свіже [3].

реходять у суспензію. Клітини даної лінії більш-менш однорідні за розмірами та мають округле ядро, подекуди спостерігаються багатоядерні клітини та клітини-гіганти (рис. 1, а). На рис. 1, б у лівому верхньому кутку видно ділянку багатоядерного росту.



а)

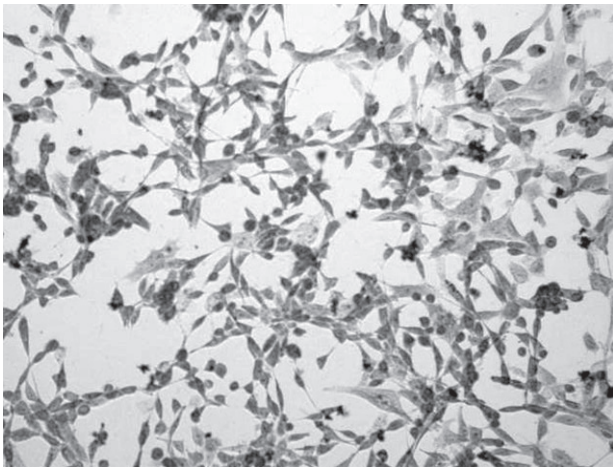


б)

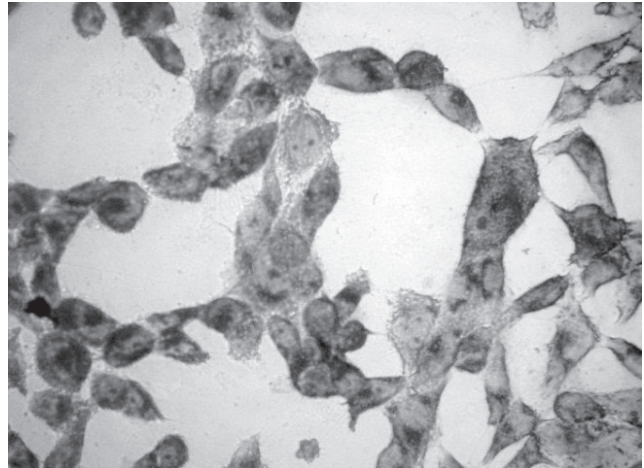
Рис. 1. Мікрофотографія клітин лінії 4BL 163пасаж, забарвлення нейтральним червоним, 600x

Цікавим є характерна гістоархітекtonіка клітин в культурі: вони розташовуються не безладно та стохастично на поверхні культурального посуду, а часто утворюють клітинні асоціації, серед яких є типовими колові та напівколові

структури (рис. 2). Останній факт може свідчити про наявність у даної клітинної лінії стовбурового потенціалу, що підтвердилось у спеціально проведених дослідженнях.



а)

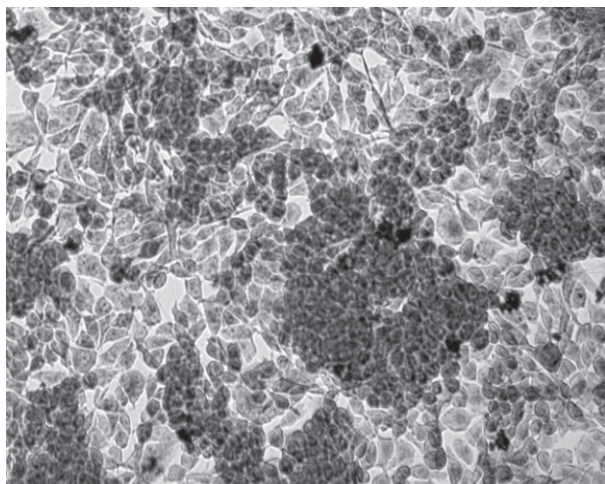


б)

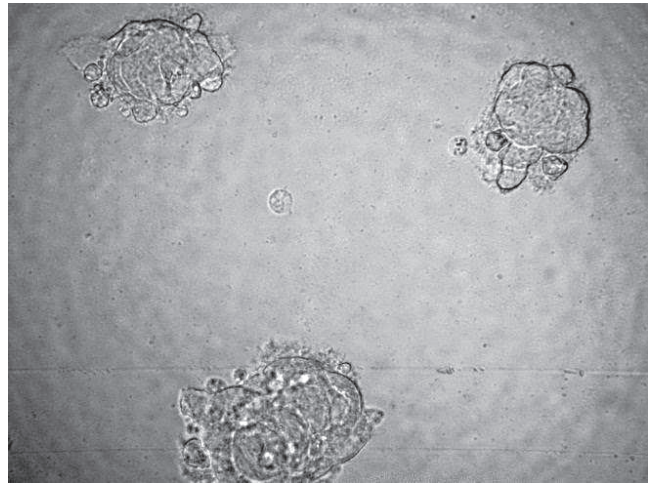
Рис. 2. Гістоархітектоніка клітинної лінії 4BL, забарвлення нейтральним червоним: а) 163 пасаж, 120х, б) 226 пасаж, 600х

Клітинна лінія 4BL вирощується як стандартна моношарова культура, проте при досягненні конфлуентного моношару за вчасної зміни

середовища, клітини здатні до багат шарового росту, і ця властивість не залежить від кількості пасажів (рис. 3, а).



а)



б)

Рис. 3. а) мікрофотографія з ділянками багат шарового росту лінії 4BL, 127 пасаж, забарвлення нейтральним червоним, 300х, б) мікрофотографія незабарвлених багат шарових колоній лінії 4BL С13, 17-й пасаж, 600х

Клітини цієї лінії здатні рости в напіврідких середовищах (1,4 % метилцелюлозі та 0,3 % агарі), формуючи утворення, подібні до ембріодних тіл, а інколи і величезних конгломератів, що більш детально розглянуто раніше [4]. Тест в напіврідкому агарі є неоднозначним і може вказувати як на малігнізацію клітинної лінії в процесі культивування, так і на наявність у неї стовбурового потенціалу. Відомо, що здатність рости в напіврідкому середовищі мають як злоякісні клітини, так і плюрипотентні стовбурові клітини, а також мультипотентні стовбурові крово-

творні клітини [3].

Загалом, клітинна лінія 4BL та її клони мають однакову морфологію, здатні формувати напівколові та колові утворення на поверхні культурального посуду та здатні до багат шарового росту після досягнення конфлуентного моношару. Проте клони лінії 4BL мають цікаву особливість: ми спостерігали формування багат шарових колоній не в напіврідкому середовищі, а на поверхні культурального посуду при звичайному культивуванні (рис. 3, б).

Наступним етапом роботи було отримання

та аналіз кривих росту. Знання стадії росту культури і параметрів її кінетики є критичним для планування певних експериментів в культурі клітин, оскільки на різних стадіях кривої росту клітини значно відрізняються між собою за властивостями. Клітинна лінія 4BL характеризується майже повною відсутністю lag-фази на 146-му та 224-му пасажі, клітини одразу переходять до експоненційного росту, коротка lag-фаза спостерігалась на 136-му пасажі. Цікавою особливістю даних кривих росту є їх ступінчастість. Перший період експоненційного росту на пасажах 136 і 146 триває три доби, далі йде точка переходу і ріст клітин сповільнюється на добу, а з четвертої доби починається наступний період експоненційного росту, який на 136-му пасажі продовжується до сьомої доби, а далі йде на спад, а на 146-му триває до п'ятої доби. На 224-му пасажі спостерігається подібна картина, проте період сповільнення росту триває довше: з другої по п'яту добу, далі добу триває другий період експоненційного росту, а з шостої по сьому добу спостерігається фаза плато (рис. 5).

Ще одна цікава особливість кривих росту клітинної лінії 4BL – двохступінчата стадія сповільнення росту з формуванням двох піків мак-

симальної чисельності клітин, що нагадує затухаючі коливання фізичних явищ. Простою мікробіологічною гіпотезою про виснаження основного джерела живлення (глюкози) та відповідне сповільнення росту клітин, а потім перехід клітин на додаткове джерело живлення і відповідно, відновлення фази експоненційного росту [6], дане явище пояснити не можна, оскільки культуральне середовище регулярно змінювалось. Можливо, клітини досягають певної максимальної чи суб-максимальної кількості і далі частина клітин гине – відповідно реєструється спад кривої росту; мертві клітини, не прикріплені до субстрату при зміні середовища втрачаються, таким чином, звільняється певна кількість вільного простору, яке намагаються зайняти сусідні клітини. Вони вступають у мітотичний цикл, і відповідно, на кривій росту спостерігається ще один пік, а далі при такій кількості клітин накопичуються токсичні метаболіти, що незворотно пригнічує життєдіяльність клітин та веде їх до поступової загибелі.

Криві росту клонів лінії 4BL були подібні до кривих росту самої лінії з характерним двохступінчатим зниженням кількості клітин та формуванням двох піків кривої росту.

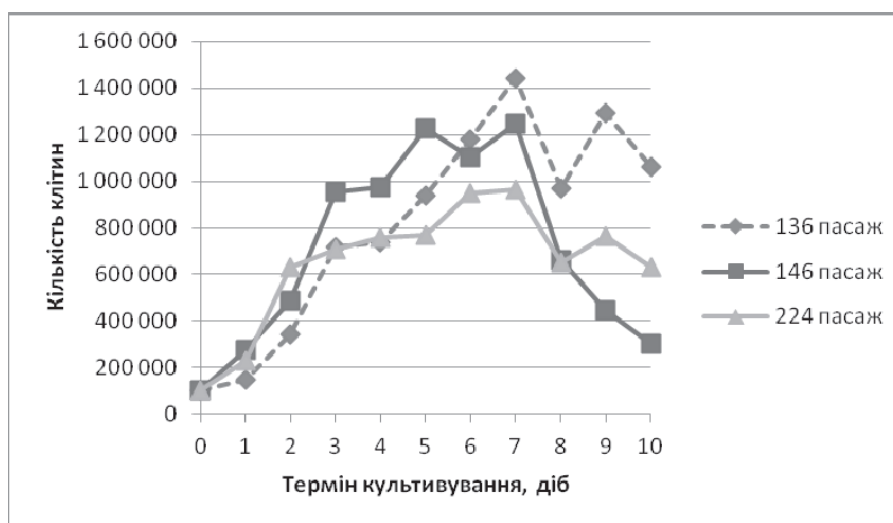


Рис. 5. Криві росту клітинної лінії 4BL6: 136-й, 146-й та 224-й пасажі

Висновки

Клітинна лінія 4BL та її клони морфологічно характеризуються двома найбільш вираженими типами клітин: фібробластоподібними та епітеліоподібними, крім того, вони формують колові та напівколові структури на поверхні

культурального посуду. Характерною особливістю кривих росту даної лінії та її клонів є двохступінчатим зниженням при падінні кількості клітин з формуванням двох піків максимальної чисельності.

Література

1. Sng J., Lufkin T. Emerging Stem Cell Therapies: Treatment, Safety, and Biology // Stem Cells International. – 2012. – P. 1–9.
2. Jacobs S.A., Roobrouck V.D., Verfaillie C.M., Gool S.W.V. Immunological characteristics of human mesenchymal

- stem cells and multipotent adult progenitor cells // *Immunol. Cell Biol.* – 2013. – Vol. 91, №1. – P. 32–39.
3. Фрешни Р.Я. Культура животных клеток: практическое руководство. – М.: Бинум. Лаборатория знаний, 2010. – 691 с.
 4. Лукаш Л.Л., Яцишина А.П., Кушнирук В.О., Пидпала О.В. Репрограммирование соматических клеток взрослого человека *in vitro* // Фактори експериментальної еволюції організмів. – К: Логос, 2011. – Т. 11. – С. 493–498.
 5. Кушнирук В.О., Кочубей Т.П., Мацевич Л.Л., Рубан Т.П., Лукаш Л.Л. Дослідження каріотипу нової лінії клітин людини 4BL6 при тривалому культивуванні *in vitro* // Фактори експериментальної еволюції організмів. – К: Логос, 2012. – Т. 3. – С. 313–318.
 6. Morange M. The scientific legacy of Jacques Monod // *Research in Microbiology.* – 2010. – Vol. 161. – P. 77–81 p.

KUSHNIRUK V.O., RUBAN T.P., LUKASH L.L.

Institute of Molecular Biology and Genetics of NAS of Ukraine

Ukraine, 03680, Kyiv, Zabolotnogo str., 150, e-mail: kushniruk_v_o@ukr.net

MORPHOLOGICAL AND GROWTH PECULIARITIES OF NEW HUMAN CELL LINE 4BL

Morphology of cells and growth curve are important characteristics of cell line, so the *aim* of this research was to study these peculiarities. **Methods.** We investigated original cell line 4BL, obtained from peripheral blood of healthy donor, which was successfully passed through the Heyflick limit. Methods of cell cultivation and standard cytological methods were used. **Results.** Cell line 4BL and its clones consist of two main types of cells: fibroblast-like and epithelioid. Cells have non-random distribution on the surface of culture dish and form cycle-like structures. These properties indirectly denote about stem potential of these cells, what have been confirmed by special investigations. Growth curves had graded character: virtually absence of lag-phase, two periods of exponential growth with phase of growth impairment between them, virtually absence of stationary phase and two peaks with maximum quantity of cells and accordingly two-step decreasing. **Conclusions.** Fibroblast-like and epithelioid cells are two main morphological types of cell line 4BL, so as it's clones 1, 2 and 3. Ability to form cycle structures at the surface of culture dish was observed. Growth curves had graded character.

Key words: human cell line, growth curves, stem cells.

МАКУХ Г.В., ГНАТЕЙКО О.З.

ДУ «Інститут спадкової патології НАМН України»

Україна, 79008, Львів, вул. Лисенка, 31 а, e-mail: makukh.h@ihp.lviv.ua

РОЗРОБКА ПІДХОДІВ ДЛЯ ХАРАКТЕРИСТИКИ СЕГРЕГАЦІЙНОЇ СКЛАДОВОЇ ГЕНЕТИЧНОГО ТЯГАРЯ У ЛЮДИНИ

У популяціях людини накопичений тягар генетичної патології і значна частка інвалідизації припадає на спадкові хвороби, які спричинені мутаціями, що накопичені еволюційно [1]. Успадковані мутантні алелі генів, які є причиною розвитку хвороб людини, є сегрегаційною складовою генетичного тягаря [2] й одна з головних концепцій медичної генетики полягає у визнанні положення про їх еволюційне накопичення [3]. Це зумовлює актуальність вивчення спектру, розповсюдження, зв'язку з фенотипом різних алельних варіантів гена у кожній конкретній «крайовій» популяції, етнічній чи територіальній групі [4, 5].

Дослідження, проведені в окремих регіо-

нах України методами генетичного моніторингу, переважно фокусувалися на мутаційній складовій, разом з тим, вони показали й значну частку сегрегаційної складової генетичного тягаря. Єдиного підходу для обчислення сегрегаційної складової генетичного тягаря немає, проте дані про сегрегаційну складову генетичного тягаря є необхідними для проведення медико-генетичного консультування, розрахунку генетичного ризику, запровадження програм масового скринінгу та планування профілактичних заходів у системі охорони здоров'я населення. Мета роботи: розробити та запропонувати підходи для характеристики сегрегаційної складової генетичного тягаря.