

Продемонстрировано роботу полученных специфических поликлональных антител в твердофазном иммуноферментном анализе, иммунопреципитации и иммуноблот-анализе.

#### **Литература**

1. Dynamic alteration of human b-defensin 2 localization from cytoplasm to intercellular space in psoriatic skin / Wook-Kang Huh, Takashi Oono, Yoshinori Shirafuji [et al.] // *J. Mol. Med.*— 2002.— Vol.80.— P. 678–684.
2. Получение рекомбинантного шаперона GroEL и его иммунологическая кросс-реактивность с Hsp60 / Л.Н. Капустян, Р.Г. Киямова, В.С. Гришкова [и др.] / *Биополимеры и клетка.*— 2006.— Т.2, №22.— С. 117–120.
3. *Bradford M. M.* A rapid and sensitive method for quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding / *Marian M. Bradford* // *Analytical Biochemistry.*— 1976.— Vol.86.— P. 193–200.
4. Idiopathic dilated cardiomyopathy in the young: Clinical profile and natural history / *Taliercio C.P., Seward J.B., Driscoll D.J.* [et al.] // *JACC.*— 1985.— Vol.6.— P. 1120–1126.
5. *Laemmli U.K.* Cleavage of structural proteins during the assembly of the bacteriophage T4 / *Ulrich K. Laemmli* // *Nature.*— 1970.— 227, №52.— P. 680–685.
6. *P.V. Pogrebnoy et al.* *Experimental Onkology*, March 2003, 25, p. 36–39.

#### **Резюме**

В работе продемонстрировано результаты получения специфических поликлональных антител против человеческого  $\beta$ -дефенсина-2. Показано роботу полученных анти-hBD-2 антител в твердофазном иммуноферментном анализе, иммунопреципитации и иммуноблот-анализе.

В роботі продемонстровано результати отримання специфічних поліклональних антитіл проти людського  $\beta$ -дефенсину-2. Показано роботу отриманих анти-hBD-2 антитіл в твердофазному імуноферментному аналізі, імунопреципітації та імуноблот-аналізі.

The results of the purification of high affinity polyclonal antibodies against human  $\beta$ -defensin-2 are represented in the work. Purified anti-hBD-2 antibodies were examined in ELISA, immunoprecipitation as well as in western blot analysis.

**<sup>1</sup>ЗУЕВА М.И., <sup>2</sup>АТРАМЕНТОВА Л.А.**

*<sup>1</sup>ГУ “Институт дерматологии и венерологии АМН Украины” Украина, 61057, Харьков, ул. Чернышевская, 7/9, e-mail: mahaqq@yandex.ru*

*<sup>2</sup>Харьковский национальный университет имени В.Н. Каразина, Украина, 61077, Харьков, пл. Свободы, 4, e-mail: wshkoda23@rambler.ru*

### **ПОЛИМОРФИЗМ 1258G/A ГЕНА SPINK-5 ПРИ ХРОНИЧЕСКОЙ КРАСНОЙ ВОЛЧАНКЕ**

Хроническая красная волчанка — заболевание, связанное с аутоиммунными патологиями. Для него характерно поражение кожи и соединительной ткани. О роли генетических факторов в развитии этого заболевания свиде-

тельствуют результаты семейных, близнецовых [2] и иммуногенетических исследований [4, 7]. Понимание природы заболеваний связывают с анализом кандидатных генов, среди которых большое внимание исследователей привлекает ген *SPINK-5* (serine protease inhibitor Kazal-type-5) — ингибитор сериновых протеаз пятого Казал-типа, локализованный на хромосоме 5q. Его продукт — ингибитор сериновых протеаз, принимает участие в противовоспалительных и антимикробных процессах, контролирует дифференцировку эпителия и организацию межклеточного матрикса, регулирует ангиогенез и клеточную адгезию [6, 9]. Полиморфизм гена *SPINK-5* связан с аллергиями, астмой, синдромом Нетертона, целиакией и др. [8, 10]. Полиморфизм *1258G/A* относится к экзону 14 и обуславливает аминокислотный полиморфизм (Glu 420 Lys) белка *SPINK-5*. В данной статье представлены результаты исследования SNP *1258G/A* экзона 14 гена *SPINK-5* при хронической красной волчанке.

### Материалы и методы

Исследована ДНК 76 больных хронической красной волчанкой и 96 человек без признаков этого заболевания. Все обследованные — жители Харькова и Харьковской области, украинцы и русские. Выделение ДНК проведено фенольным методом из лейкоцитов периферической крови по стандартной методике [3]. Генотипирование выполнено методом ПДРФ (полиморфизм длин рестрикционных фрагментов). Амплификация фрагмента 14 экзона гена *SPINK-5* длиной 304 пары нуклеотидов проведена при помощи ПЦР (полимеразной цепной реакции) с использованием праймеров — 5'-*TGC AAT TGT GAG GAT TTC ACA G-3'* / 5'-*CCT GAA CAT GAT CTG TGG ATC-3'* [9]. Температурный режим: 95 °C 30 секунд, 52 °C 30 секунд, 72 °C 40 секунд. Объём рестрикционной смеси — 30 мкл. Амплифицированные фрагменты подвергали действию рестриктазы *HphI* (Fermentas, Литва), которая, если в положении 197 находится аденин, разрезает фрагмент в последовательности *GGTGA(N)8* на два участка, и на три, если в этом положении находится гуанин. Рестриктазу добавляли из расчёта три единицы на 30 мкл смеси после ПЦР. Образцы инкубировали в течение ночи при температуре 37 °C. Детекцию проводили с помощью электрофореза в 3% агарозном геле. Рестрикционные фрагменты соответствовали трём генотипам (рис. 1). Проверку гипотез о равенстве частот аллелей и генотипов в основной и контрольной группах, а также распределении фактических и теоретически ожидаемых частот генотипов проводили с помощью критерия  $\chi^2$  на уровне значимости 0,05 [1].

### Результаты и обсуждение

Частоты SNP *A/G* различны у мужчин и женщин контрольной группы (табл. 1). У мужчин более частым оказался аллель *G* (0,64), у женщин — аллель *A* (0,59,  $p < 0,01$ ). Это сделало необходимым проводить дальнейшие сравнения с учётом пола. Разница в частоте аллелей между основной и контрольной группами выявлена только у мужчин. Частота SNP *A* у мужчин с ХКВ составляет 0,69, что в 1,9 раза выше, чем у здоровых — 0,36 ( $p < 0,001$ ).

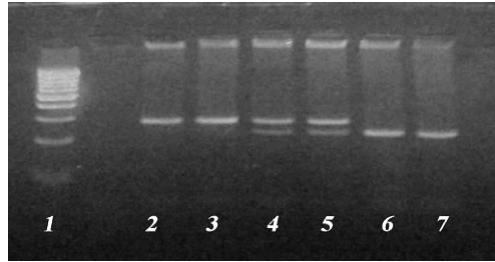


Рис. 1. Электрофореграмма ПЦР-продуктов ДНК шести человек, генотипированных по полиморфизму 1258G/A гена *SPINK-5*: (1 — маркер молекулярной массы; 2, 3 — генотип AA; 4, 5 — генотип AG; 6, 7 — генотип GG)

Таблица 1

**Распределение аллелей и генотипов SNP *SPINK-5***

Группа	Пол	n	Генотипы <i>SPINK-5</i>			Частоты SNP	
			AA	AG	GG	A	G
Контроль	Мужской	37	6	15	16	0,36	0,64
	Женский	59	20	30	9	0,59	0,41
Больные ХКВ	Мужской	35	16	16	3	0,69	0,31
	Женский	41	13	21	7	0,57	0,43

Примечание. n — число обследованных, ХКВ — хроническая красная волчанка.

Таблица 2

**Частоты генотипов (%)**

Группа	Пол	Фактические			Теоретические		
		AA	AG	GG	AA	AG	GG
Контроль	Мужской	16,22	40,54	43,24	13,32	46,35	40,33
	Женский	33,90	50,85	15,25	35,19	48,27	16,54
Волчанка	Мужской	45,71	45,71	8,58	47,02	43,10	9,88
	Женский	31,70	51,22	17,08	32,86	48,93	18,21

Распределение генотипов у мужчин и женщин основной и контрольной групп соответствует равновесию Харди-Вайнберга (табл. 2). Половые различия в частоте аллелей изученного аутосомного гена пока не находят генетического объяснения. Прояснить ситуацию позволит расширение выборки в ходе дальнейших исследований.

Различия в частоте генотипов у больных и здоровых выявлены только в мужской группе (табл. 2). Больные мужчины в 2,8 раза чаще, чем здоровые являются обладателями генотипа AA, в пять раз реже имеют генотип GG ( $p < 0,01$ ). Продукт гена *SPINK-5* белок SPINK-5 является негативным регулятором иммунного ответа, поэтому уменьшение его активности может инициировать аутоиммунные процессы, которые приводят к развитию хронической

красной волчанки [2]. Эти нарушения также могут быть связаны с изменением на уровне дифференцировки клеток иммунного ответа, который также контролируется продуктом гена *SPINK-5*. Известна также роль *SPINK-5* в формировании барьерной функции кожи и, в частности, защиты от ультрафиолетового излучения, инфекционных агентов, химически активных веществ и других неблагоприятных факторов внешней среды [5]. Перечисленные свойства этого белка убеждают в необходимости дальнейшего исследования гена *SPINK-5*, что позволит полнее понять природу исследованного заболевания и найти молекулярные маркеры наследственной предрасположенности.

### Литература

1. Гланц С. Медико-биологическая статистика.— М.: Практика.— 1998.— 459 с.
2. Дядык А.И., Багрий А.Э., Ракитская И.В., Щукина Е.В. Системная красная волчанка: некоторые вопросы этиологии и патофизиологии // Украинський ревматологічний журнал.— 2009.— №2.— С. 61–66.
3. Маниатис Т., Фрич Э., Сэмбрук Дж. Методы генной инженерии. Молекулярное клонирование: Пер. с англ.— М.: Мир, 1984.— 480 с.
4. Ardoin S.P., Pisetsky D.S. Developments of the scientific understanding of lupus // *Athr. Res. Ther.*— 2008.— №10.— P. 218–226.
5. Deraison C., Bonnart C., Lopez F., Besson C. et al. LEKTI fragments specifically inhibit KLK5, KLK7, and KLK14 and control desquamation through a pH-dependent interaction // *Mol. Biol. Cell.*— 2007.— Vol.18, №9.— P. 3607–3619.
6. Godic A., Dragos V. Successful treatment of Netherton's syndrome with topical calcipotriol // *Europ. J. Dermatol.*— 2004.— Vol.14, №1.— P. 115–117.
7. Horvitz D.A. Regulatory T cells in systemic lupus erythematosus: past, present and future // *Athr. Res. Ther.*— 2008.— №10.— P. 226–235.
8. Hubiche T., Ged C., Benard A., Leaute-Labreze C. et al. Analysis of *SPINK 5*, *KLK 7* and *FLG* genotypes in a French atopic dermatitis cohort // *Acta Derm Venereol.*— 2007.— Vol.87, №6.— P. 499–505.
9. Kabesch M., Carr D., Weiland S.K., von Mutius E. Association between polymorphisms in serine protease inhibitor, kazal type 5 and asthma phenotypes in a large German population sample // *Clin. Exp. Allergy.*— 2004.— Vol.34, №2.— P. 340–345.
10. Wapenaar M., Monsuur A., Poell J., van 't Slot R. et al. The *SPINK* gene family andeliac disease susceptibility // *Immunogenetics.*— 2007.— Vol.59, №5.— P. 349–357.

### Резюме

Структура славянского населения Харькова и Харьковской области по однонуклеотидному полиморфизму *1258A/G* гена *SPINK-5* соответствует равновесному состоянию. Аллель *A* является фактором повышенного риска по хронической красной волчанке у мужчин.

Структура слов'янського населення Харкова і Харківської області за однонуклеотидним поліморфізмом *1258A/G* гену *SPINK-5* відповідає стану рівноваги. Алель *A* є фактором підвищеного ризику по хронічному червоному вовчаку у чоловіків.

Slavic population structure of Kharkov and region of single-nucleotide polymorphism *1258A/G* gene *SPINK-5* corresponds to the equilibrium state. Allel *A* is high-risk factor of chronic lupus erythematosus in men.

**ЛИЛО В.В., КОЦАРЕНКО К.В., МАНЬКО В.Г., МАЦЕВИЧ Л.Л.,  
РУБАН Т.А., ЛУКАШ Л.Л.**

*Інститут молекулярної біології і генетики НАН України,  
Україна, 03143, вул. Заболотного, 150, e-mail: lukash@imb.org.ua*

## **ЦИТОКИНИ ЯК ПОТЕНЦІЙНІ МОДУЛЯТОРИ РЕПАРАЦІЇ ПЕРВИННИХ УШКОДЖЕНЬ, ІНДУКОВАНИХ АЛКІЛУВАЛЬНИМИ СПОЛУКАМИ**

Забруднення довкілля є одним з основних факторів, що впливають на стабільність геному. Серед розмаїття антропогенних чинників, що здатні спричиняти генотоксичну дію, можна виділити групу алкілувальних речовин. Вони є досить поширеними пошкоджуючими чинниками хімічної природи — в тому числі, як фактори промислового забруднення та професійного ризику.

Одним з генопротекторних механізмів, що протидіють мутагенному впливові алкілувальних сполук на клітинну ДНК, є репарація первинних пошкоджень, індукованих цими сполуками, що здійснюється, зокрема, репаративним ферментом *O*<sup>6</sup>-алкілгуанін-ДНК алкілтрансферазою (*MGMT*). Цей фермент реалізує пряму репарацію найбільш мутагенно- та канцерогеннонебезпечного пошкодження — *O*<sup>6</sup>-алкілгуаніну в клітинній ДНК [1, 2]. Таким чином, знижений рівень експресії та/або активності цього ферменту є важливим фактором ризику для людей, чия професійна діяльність передбачає контакт з алкіляторами. Тому важливо якомога краще зрозуміти механізми, що регулюють експресію цього ферменту.

Ці регуляторні механізми є складними і на сьогоднішній день недостатньо вивченими. Так, відомо, [3] що цей фермент є індукційним; його експресія може зростати у відповідь на ряд чинників (гіперметилування ДНК, розриви ДНК, тощо). Експресія *MGMT* може також регулюватися опосередкованим шляхом — через вплив регуляторних механізмів клітини (*p53*-опосередковані, протеїнкіназа *C*-опосередковані, фосфорилування, убіквітинування, тощо). Існують дані, що на експресію *MGMT* можуть впливати також цитокіни та фактори росту (інтерферон  $\beta$ , *IL-3* — окремо чи в сполученні з *SCF*, а також *GM-CSF*) [4] — проте саме цей аспект проблеми вивчений недостатньо, і в літературі наявні лише поодинокі відомості, що стосуються цього питання. Наприклад, *IFN- $\beta$*  знижує транскрипцію гену *MGMT* через індукцію експресії білка *p53*. Тому *IFN- $\beta$*  може знижувати рівні *MGMT* в клітинах гліоми через інгібування транскрипції гену *MGMT* [5].

Цитокіни є групою поліпептидних медіаторів, що беруть участь у формуванні і регуляції захисних реакцій організму. До цитокінів відносяться інтерферони, колонієстимулюючі фактори, інтерлейкіни, хемокіни, трансформуючі ростові фактори, група факторів некрозу пухлин і деякі інші. Біологічні ефекти цитокінів реалізуються через специфічні клітинні рецепторні комплекси. Гіперпродукція цитокінів веде до розвитку системної запальної реакції і може слугувати причиною розвитку ряду патологічних станів. На рівні