

**НАЦІОНАЛЬНА АКАДЕМІЯ НАУК УКРАЇНИ
ІНСТИТУТ МОЛЕКУЛЯРНОЇ БІОЛОГІЇ І ГЕНЕТИКИ**

Кочубей Тетяна Олександрівна



УДК 579.69 : 577.12

**ВПЛИВ ФІТОГЕМАГЛЮТИНІНУ І ЙОГО ІЗОЛЕКТИНІВ НА
ЖИТТЄЗДАТНІСТЬ ТА АПОПТОЗ СОМАТИЧНИХ КЛІТИН ССАВЦІВ
*IN VITRO***

03.00.03 – молекулярна біологія

**Автореферат
дисертації на здобуття наукового ступеня
кандидата біологічних наук**

Київ – 2017

Дисертацією є рукопис.

Роботу виконано у відділі генетики людини Інституту молекулярної біології і генетики НАН України (м. Київ).

Захист дисертації відбудеться «28» березня 2017 р. о 10³⁰ годині на засіданні спеціалізованої вченої ради Інституту молекулярної біології та генетики НАН України за адресою: 03680, м. Київ, вул. Академіка Заболотного, 150.

Науковий керівник кандидат біологічних наук, старший науковий співробітник
Півень Оксана Олександрівна,
Інститут молекулярної біології і генетики НАН України,
старший науковий співробітник відділу генетики людини.

Офіційні опоненти: доктор медичних наук, професор
Досенко Віктор Євгенович,
Інститут фізіології імені О.О. Богомольця НАН України,
завідувач відділу загальної та молекулярної патофізіології;

доктор біологічних наук, професор
Мінченко Олександр Григорович,
Інститут біохімії імені О.В. Палладіна НАН України,
завідувач відділу молекулярної біології.

З дисертацією можна ознайомитись у бібліотеці Інституту молекулярної біології і генетики НАН України за адресою: 03680, м. Київ, вул. Академіка Заболотного, 150.

Автореферат розіслано лютого 2017 року.

Вчений секретар
спеціалізованої вченої ради,
кандидат біологічних наук
старший науковий співробітник.



І.В. Крупська

ЗАГАЛЬНА ХАРАКТЕРИСТИКА РОБОТИ

Актуальність теми. У зв'язку з майже епідеміологічною ситуацією поширення онкологічних захворювань важливими стають дослідження механізмів проліферації та програмованої гибелі клітини, а також пошук речовин, що здатні індукувати апоптоз вибірково у злоякісних клітинах. Нині на підґрунті існуючих знань про молекулярні механізми апоптозу та його основних чинників постійно проводиться пошук молекул як природного, так і синтетичного походження, що здатні активувати апоптоз у клітині. Так, розроблено велику кількість хімічних сполук, антитіл, тощо які досить ефективно здатні індукувати апоптоз ініціюючи ту чи іншу ланку сигнального каскаду винятково у злоякісних клітинах (Kong et al., 2000; Wong et al., 2011). Однак, зважаючи на певні клінічні вимоги, а саме: безпечність речовини для інших клітин та організму в цілому, високу специфічність дії речовини та низьку собівартість, актуальним є пошук природних полімерів з низькою токсичністю та проапоптичним потенціалом. І серед таких особливу увагу привертає група широко розповсюджених у природі білків – лектинів.

Лектини є активно досліджуваними білками, які широко застосовуються у клінічній діагностиці, використовуються як інструмент при проведенні досліджень у галузі біології клітини та цитогенетики (Маслак та ін., 2014; Сибірна, 2015). Але при цьому вивчення біологічної природи цієї групи білків та їхніх потенційних активностей в основному не виходили за межі досліджень вуглеводзв'язувальної дії, або ж цито- та загальнотоксичної дії лектинів. Проте вплив лектинів на апоптоз клітин ссавців досі лишався поза увагою дослідників. Лише протягом останніх років з'явилися поодинокі експериментальні роботи (Пивень и др., 2011), що свідчать про здатність лектинів рослинного та тваринного походження індукувати апоптоз клітин ссавців як через рецептор-залежний так і мітохондріальний сигнальні шляхи. Такі дослідження знову привернули увагу вчених до, вже начебто добре вивчених, білків – лектинів. Оскільки, окрім потенційної проапоптичної дії лектини здатні до вибіркового зв'язування з клітиною залежно від вуглеводної специфічності білка та стану клітини. І, що не менш важливо, лектини широко представлені у різноманітній рослинній та тваринній сировині, що робить їх легкодоступними та відносно недорогими речовинами.

У представленій роботі увагу було зосереджено на дослідженні лектину квасолі звичайної *Phaseolus vulgaris* або фітогемаглютиніну (ФГА). Цей лектин широко відомий перш за все як мітоген; також було показано і його еритроаглютинуючу та лейкоаглютинуючу дії (Антонюк, 2005). Подальші дослідження цього лектину виявили багато цікавих фактів стосовно його молекулярної будови та вуглеводної специфічності. Фітогемаглютинін є гетеротетрамером, який складається з двох ізолектинів, які можуть перебувати у п'яти різних комбінаціях (Антонюк, 2005). Цікавим є те, що окрім мітогенної дії ізолектини ФГА мають досить цікаву вуглеводну специфічність. А саме лейкоцитарний ізолектин фітогемаглютиніну (ФГА-Л), на відміну від еритроцитарного (ФГА-Е), може розпізнавати три – і тетраантенні β -1-6-N-ацетилглюкозамінні залишки N-гліканів, підвищення експресії яких на поверхні

деяких злоякісних клітин свідчить про метастазування та прогресію пухлини (Yamamoto et al., 2000). Така властивість разом із поодинокими даними про низьку токсичність лектину квасолі звичайної дала змогу висунути припущення, що цей лектин має більший спектр біологічної активності і може бути досить перспективним для потенційного використання в онкобіології, а саме як специфічний поверхневий маркер, або як специфічний активатор апоптозу. Це припущення було підтверджено експериментально іншими авторами. Було показано здатність еритроцитарного ізолектину червоної квасолі індукувати апоптоз у культурі клітин раку легенів людини (Kuo et al., 2011). Варто зауважити, що вибірковість зв'язування деяких лектинів, зокрема ФГА, із певними типом метастазуючих клітин разом із здатністю індукувати апоптоз робить цей клас білків надзвичайно цікавим об'єктом досліджень. Тож, у представленій роботі увагу було зосереджено на не вивчених, або недостатньо добре відомих питаннях, а саме: вплив ФГА та його ізолектинів на проліферацію та виживаність злоякісних та умовно нормальних клітин ссавців, можливі концентраційні залежності такої дії; проапоптичні властивості лектинів квасолі звичайної; можливе зв'язування лектинів із рецепторами «смерті» та «проліферації».

Таким чином, дана робота присвячена вивченню біологічної активності лектинів, а саме: малодосліджених аспектів дії лектинів на процес програмованої гибелі клітини та потенційних механізмів реалізації проапоптичних властивостей лектинів ФГА. Результати дисертаційної роботи є важливими не лише для фундаментальних знань у галузі клітинної біології та лектинології, а й можуть мати певне практичне значення для розвитку та створення нових альтернативних підходів протипухлинної терапії. Робота є оригінальною тим, що виконувалась на перехресті інтересів класичної клітинної біології та лектинології, а саме: було виявлено нову не класичну властивість лектинів та уточнено і доповнено деякі механізми програмованої гибелі клітини.

Зв'язок роботи з науковими програмами, планами, темами. Роботу виконано в рамках наукових проектів відділу генетики людини Інституту молекулярної біології та генетики НАН України «Особливості експресії гена репаративного ензиму Об-алкілгуанін-ДНК алкілтрансферази в умовно нормальних та пухлинних клітинах» (шифр теми 2.2.4.17, № держреєстрації 0108U008526, 2009-2013 рр.) та «Регуляція експресії гена репаративного ензиму MGMT під впливом деяких біологічно активних речовин (гормонів, цитокінів, лектинів та ін.) у клітинах ссавців» (шифр теми 2.2.4.17, № держреєстрації 0115U000355, 2014-2018 рр.), а також проекту отриманого на конкурсних засадах відповідно до Постанови Президії НАН України № 50 від 24.02.10 р: "Вплив вуглеводзв'язувальних білків на сигнальні шляхи апоптозу клітин в умовах *in vitro*" (№ держреєстрації 0109U006250, 2009-2010 рр.)

Мета і завдання дослідження. Дослідити проапоптичні властивості сумарного препарату фітогемаглютиніну та його окремих ізолектинів у культурі клітин ссавців. З'ясувати можливі молекулярно-біологічні механізми, залучені до реалізації проапоптичної дії ФГА.

Для досягнення цієї мети необхідно було вирішити такі завдання:

1. Вивчити вплив ФГА та його ізолектинів на виживаність та проліферацію культур клітин пухлинного та непухлинного походження, з'ясувати залежність їхньої біологічної дії від концентрації білка.

2. Дослідити зміни морфології ядра під дією досліджуваних препаратів ФГА у культурах соматичних клітин.

3. Дослідити молекулярні шляхи індукції апоптозу сумарним препаратом ФГА та його окремими ізолектинами у культурах соматичних клітин пухлинного та непухлинного походження.

4. Із застосуванням комп'ютерних методів аналізу дослідити можливість зв'язування молекул лектину ФГА та рецепторів апоптозу. Проаналізувати характер такої взаємодії.

Об'єкт дослідження даної роботи – індукований ізолектинами фітогемаглютиніну апоптоз у популяціях клітин ссавців *in vitro*, зміни рівня експресії про- та антиапоптичних білків клітин, специфічність та енергія зв'язування ізолектинів ФГА і рецепторів клітин, що залучені у апоптичні сигнальні каскади.

Предметом дослідження – біологічна активність ізолектинів фітогемаглютиніну та сумарного препарату ФГА, проліферація та виживання клітин ссавців у культурі *in vitro* під дією досліджуваних лектинів, апоптоз, індукований лектинами.

Методи дослідження – молекулярно-біологічні: виділення та електрофоретичне розділення білків у поліакриламідному гелі у присутності додецилсульфат натрію, Вестерн-блот аналіз вмісту білків із застосуванням специфічних антитіл; виділення мРНК, синтез кДНК та ПЛР у реальному часі. Методи клітинної біології: культивування клітин ссавців *in vitro*, мікрокультуральний тест для виявлення впливу лектинів на проліферацію та виживання клітин, аналіз морфології ядер клітин, забарвлених етидіумом бромідом та акридиновим помаранчевим. Для біоінформатичного аналізу можливих взаємодій лектинів ФГА та рецепторів клітинної мембрани застосували метод молекулярного Докінгу. Статистичні методи аналізу: t-критерій Стьюдента, χ -квадрат.

Наукова новизна одержаних результатів. Вперше показано дозозалежний вплив ізолектинів фітогемаглютиніну на проліферацію клітин ссавців та встановлено здатність лектинів індукувати загибель клітин, як злоякісних, так і умовно нормальних ліній за умов експерименту. Вперше виявлено здатність ізолектинів фітогемаглютиніну індукувати програмовану загибель клітини – апоптоз через стимуляцію рецептор-залежних сигнальних шляхів. Виявлено певні відмінності проапоптичної дії сумарного препарату фітогемаглютиніну та його ізолектинів залежно від обраної тест-системи, а саме у культурі умовно нормальних та злоякісних клітин. Вперше розраховано, що лейкоаглютинін здатен утворювати стабільні білок-білкові комплекси, як з «проапоптичними» рецепторами (рецептором смерті – FasR і рецептором фактора некрозу пухлини – TNF1R), так і «антиапоптичними» рецепторами (рецептором інсуліноподібного фактора росту – IGF1R та рецептором епідермального фактора росту – EGFR) клітини.

Практичне значення одержаних результатів. Виявлені у роботі особливості індукції апоптозу ізолектинами фітогемаглютиніну в умовно нормальних та злоякісних клітинах дозволяють розглядати ці білки перспективними з точки зору подальших досліджень, спрямованих на пошук та розробку нових стратегій цільової терапії злоякісних утворень шляхом підвищення рівня апоптозу саме ракових клітин. Отже, лектини у перспективі можна використовувати не лише як мітогени та біозонди для цитологічних чи імуногістохімічних робіт, але і як модулятори апоптозу та для розробки протипухлинних препаратів.

Особистий внесок здобувача. Результати викладені у дисертації отримано особисто або за безпосередньої участі дисертанта у проведенні експериментів. Планування досліджень, обговорення, аналіз, інтерпретацію отриманих даних і публікацій до друку здійснювали разом із науковим керівником к.б.н., с.н.с. О.О. Півень. Здобувачем особисто проведено серію дослідів із дослідження впливу лектинів на проліферацію і апоптоз у популяціях клітин людини та китайського хом'ячка. Проведено докінг аналіз ефективності зв'язування лейкоаглютиніну та рецепторів клітинної мембрани, що залучені у регуляцію клітинного циклу. Виконано дослідження змін рівня експресії білків та генів медіаторів апоптозу під дією сумарного препарату ФГА та його окремих ізолектинів.

Частину експериментальної роботи та теоретичний аналіз результатів виконано спільно зі співробітниками Інституту молекулярної біології та генетики НАН України відділів генетики людини Л.Л. Мацевич, Т.А. Рубан, І.С. Карповою та молекулярної онкогенетики В.О. Кітам і О.В. Максимчук, з якими автор має спільні публікації.

Апробація результатів дисертації. Загальні положення роботи висвітлено на наукових семінарах Інституту молекулярної біології та генетики НАН України та на міжнародних і вітчизняних наукових конференціях та форумах а саме: польсько-українській Вейгелівській конференції „From microbiology to synthetic biology” (Вроцлав, Польща, 2011), курсі лекцій EMBO-FEBS "Actin-Based Motility: From Molecules to Model Organisms" (Стреса, Італія, 2012), Single Cell Physiology International EMBO workshop (Париж, Франція 2012), 3-му з'їзді Українського товариства клітинної біології з міжнародним представництвом (Україна, Ялта-Лівадія, 2012), Hereditary and Familial Cancer In The Personal Genomics Era. A joint event: IV Annual IMPPC Conference 1st ICO-IDIBEL Hereditary Cancer Program Meeting (Іспанія, Барселона, 2013), 4-му З'їзді Українського товариства клітинної біології з міжнародним представництвом (Україна, Ужгород, 2014), XIV читаннях ім. В.В. Подвисоцького (Україна, Одеса, 2015). Варто зауважити, що для участі у міжнародних конференціях дисертанткою отримано чотири зарубіжних молодіжних гранти EMBO та FEBS.

Публікації. За матеріалами дисертації опубліковано 6 статей у фахових журналах та тези 10 доповідей у збірниках матеріалів конференцій.

Структура та обсяг дисертації. Дисертація складається із вступу, огляду літератури, матеріалів та методів досліджень, експериментальної частини яка має 3 розділи, аналізу і узагальнення результатів досліджень, висновків та списку використаних джерел, який налічує 149 найменувань, а також додатків. Дисертацію

викладено на 124 сторінках стандартного машинопису. Ілюстрований та числовий матеріал дисертації подано у вигляді 3 таблиць та 27 рисунків. У додатки винесено 3 рисунки і 1 таблицю.

ОСНОВНИЙ ЗМІСТ

Матеріали і методи дослідження. Експериментальну частину дослідження проведено в умовах *in vitro* із використанням культур клітин ссавців: лінія спонтанно трансформованих фібробластів китайського хом'ячка *Bld-ii-FAF28Cl237-8Glu^{ts}III*, лінія клітин раку гортані людини Нер-2, а також отриману у відділі лінію клітин людини непухлинного походження 4BL, яка була отримана з крові здорового донора (Кушнірук та ін., 2016).

У роботі використовували мінімальне культуральне середовище Ігла у модифікації (MEM, Sigma, США), яке містило 3 та 5 % проінкубованої при 56⁰C ембріональної сироватки великої рогатої худоби (ЕС, Sigma, США).

Клітини вирощували у чашках Петрі діаметром 10 см. Посівна доза становила 200-300 тис. клітин на чашку. Оптимальний об'єм середовища – 8-10 мл. Чашки Петрі із клітинами перебували у CO₂ інкубаторі, де завдяки надходженню вуглекислого газу та повітря (концентрація CO₂ у газовій суміші становила 5 %) підтримувався рівень рН на рівні 7,2 – 7,4. Культивували клітини при температурі +36,0 – 36,5⁰C.

При проведенні досліджень використовували лектини рослинного походження, а саме комерційні препарати лектинів квасолі звичайної *Phaseolus vulgaris* – фітогемаглютинін ФГА: сумарний препарат, ФГА-Л: лейкоаглютинін, ФГА-Е: еритроаглютинін – “ЛЕКТИНОТЕСТ”, (Львів, Україна).

N - метил - N – нітро - N – нітрозогуанідин (МННГ або нітрозогуанідин) простий метилувальний агент, синтезований в Інституті молекулярної біології та генетики НАН України, та люб'язно наданий для досліджень к.б.н., с.н.с А.Г. Терентьевим, використовувався у концентрації 0,5 мкг/мл як позитивний контроль апоптозу у вивченні впливу лектинів на зміни вмісту активованих каспаз та білка Вах.

Мітоміцин С (ММС) (Sigma, США) – антибіотик протипухлинної дії, використовується як цитостатик, який спричиняє зшивки ДНК та білка. Цю сполуку використовували як позитивний контроль при вивченні впливу лектинів на проліферацію культур клітин ссавців. Для обробки клітин цей хімічний агент використовували у концентрації 10 - 0,1 мкг/мл залежно від типу культури клітин.

При вивченні впливу лектинів на проліферацію клітин ссавців в умовах *in vitro* використовували мікрокультуральний метод у певній модифікації (Лукаш и др., 1997). Клітини висівали у 96- лунковий планшет по 3-5 тисяч клітин на кожну лунку та інкубували у мінімальному середовищі Ігла (MEM) із додаванням 5 % ембріональної сироватки великої рогатої худоби. Через 24 год клітини обробляли розчинами досліджуваних лектинів у діапазоні концентрацій від 0,01 до 1000 мкг/мл. Обробка клітин препаратами тривала 4 год, у контрольному варіанті клітини перебували у середовищі MEM без додавання сироватки. Після чого забарвлювали 1

% розчином барвнику бромфенолового синього та вимірювали оптичну густину при довжині хвилі 620 нм, за зміною оптичної густини оцінювали інтенсивність проліферації клітин у дослідних та контрольних варіантах.

Здатність сумарного препарату ФГА та його ізолектинів індукувати апоптоз у культурі клітин ссавців вивчали із застосуванням методу, що базується на вибіркового забарвленні певними барвниками живих та апоптичних ядер, а саме: акридинового помаранчового та етидіуму броміду (McGanon et al., 1995). Препарати аналізували під мікроскопом (ЛОМО, МЛ-2, Росія) зі збільшенням 90х, із комбінацією фільтрів, що підходять для збудження флуоресценції. При проведенні аналізу враховували три типи клітин: живі клітини – з нормальним ядром, що мали яскраво-зелений хроматин з організованою структурою, клітини у апоптозі – яскраво-зелений з жовтими включеннями або жовтий хроматин, який сильно конденсований чи фрагментований та конденсований хроматин мертвих клітин – яскраво-червоний хроматин (рис. 1)

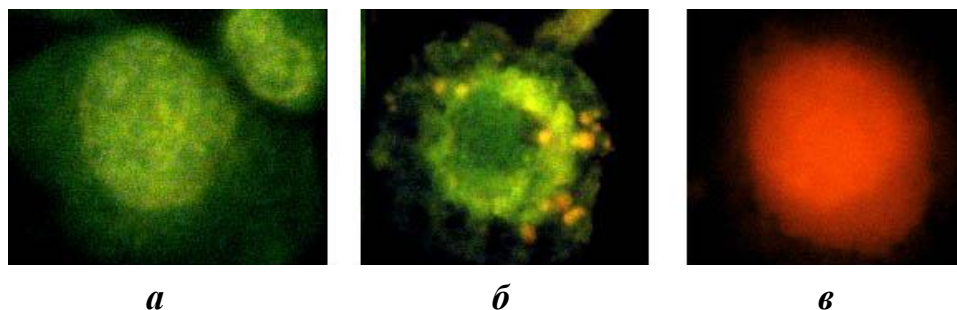


Рис. 1. Індукція апоптозу у культурі клітин раку гортані Нер-2: а - живі клітини (яскраво-зелений хроматин з організованою структурою); б - клітини у апоптозі (яскраво-зелений або жовтий хроматин, який сильно конденсований або фрагментований); в - мертві клітини (яскраво-помаранчевий хроматин). Клітини обробляли лейкоаглютиніном у концентрації 1 мкг/мл (збільшення 90х)

Апоптичний індекс (АІ) обраховували у процентах за формулою:

$$AI = \frac{\text{Кількість апоптозних клітин} \times 100}{\text{Загальна кількість обстежених клітин}}$$

Дослідження впливу лектинів на зміни вмісту розщеплених форм ефекторної каспази-3 та ініціаторної каспази-8, а також проапоптичного білка Вах проводили із застосуванням Вестерн-блот аналізу із використанням специфічних антитіл. Були використані такі антитіла: anti-Cleaved caspase-3 (p11 (h 176)-R: sc-22171, Santa Cruz Biotechnology), anti-Bax (HPA027878, Sigma), anti-Cleaved caspase-8 p18 (H134): Sc-7890 (Santa Cruz Biotechnology, США), anti-glyceraldehyde phosphate dehydrogenase (GAPDH) antibodies (G8795, Sigma, USA). Клітинні екстракти виділяли згідно стандартної методики (Morton, Margison, 1988). Визначення концентрації сумарного білка у клітинних екстрактах проводили згідно з

методикою, описаною раніше (Bradford, 1976). Електрофоретичне розділення отриманих білкових препаратів проводили у 12 % поліакриламідному гелі у присутності додецилсульфату натрію (SDS) (Laemmli, 1970).

Після розділення білки з геля переносили на нітроцелюлозну мембрану Hybond-ECL (Amersham, Німеччина) використовуючи метод напівсухого переносу на приладі CSL Semi Dry Mini System “Cleaver Scientific Ltd” (США). Режим переносу становив 135 mA протягом 40 хв – 1 год. Вестерн блот аналіз із застосуванням специфічних антитіл до досліджуваних білків проводили згідно інструкції фірми виробника. Візуалізацію та обрахунок результатів Вестерн блот аналізу здійснювали за допомогою спеціального обладнання Molecular Imager Chemi Doc XRS+ Image Lab (Bio-Rad, США). Кількість досліджуваних білків представлено у відносних одиницях, які вираховували як відношення вмісту досліджуваних білків до вмісту контрольного білка на тій самій доріжці гелю.

Зміни рівня експресії генів *Bax* і *Bcl-2* вивчали методом полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР) у реальному часі. Використовували такі пари праймерів:

Bax: forward 5'-GGGGATTTCTGACTTGAGG-3'

reverse 5'-TTGGGCTGATTTGATTTCTG-3'

Bcl-2: forward 5'-CGACTTCGCCGAGATGTCCAGCCAG-3'

reverse 5'-ACTTGTGGCCAGATAGGCACCCAG-3'

β -актин: forward 5'-GACTTCGAGCAAGAGATGGC-3'

reverse 5'-AGCACTGTGTTGGCGTACAG -3'

Експресію генів представляли як ΔC_T нормалізовану відносно референтного гена β -актину. C_T кожного цільового гена вираховували з середнього значення ΔC_T контролю. Різницю в кількості розраховували використовуючи формулу $2^{-\Delta C_T}$.

Результати досліджень та обговорення.

Дослідження впливу сумарного препарату лектину ФГА та його окремих ізолектинів на проліферацію та апоптоз клітин ссавців. Завданням першого етапу роботи було з'ясувати вплив лектинів квасолі звичайної, сумарного препарату ФГА та його окремих ізолектинів, на проліферацію та виживання клітин ссавців у умовах *in vitro*, а також виявити можливу залежність їхньої цитотоксичної або мітогенної активності від концентрації та вуглеводної специфічності сумарного препарату ФГА та його окремих ізолектинів – лейкоаглютиніну та еритроаглютиніну.

У роботі використовували три різні модельні системи: лінію фібробластів китайського хом'ячка; лінію злоякісних клітин раку гортані людини Нер-2 та лінію клітин 4BL, яку було отримано з крові здорового донора у нашому відділі раніше (Кушнірук та ін., 2016). Дію лектинів досліджували у широкому діапазоні концентрацій від 0,01 до 1000 мкг/мл.

У результаті проведеної роботи було показано, що в усіх трьох використаних тест-системах досліджувані препарати впливали на проліферацію клітин (рис. 2-4). При дії усіх досліджуваних лектинів у високих концентраціях (100-1000 мкг/мл) майже в усіх варіантах обробки спостерігалось статистично достовірне зниження кількості клітин (рис. 2-4), окрім випадку дії ФГА-Л у концентрації 100 мкг/мл у якому кількість клітин була на рівні з контролем (рис. 4). При дослідженнях з

використанням культури китайського хом'ячка було показано слабкий мітогенний ефект для усіх лектинів, окрім інгібуючої дії у випадку ФГА-Л у концентрації 1000 мкг/мл (рис. 2). У концентраційному діапазоні 0,01-10 мкг/мл у культурі клітин 4ВL спостерігався мітогенний ефект, на відміну від злоякісних клітин Нер-2, де спостерігався значний інгібуючий ефект порівняно з контролем (рис. 3-4).

Зважаючи на те, що і сумарний препарат, і окремі ізолектини ФГА дещо по-різному впливали на проліферацію клітин ссавців у досліджуваному діапазоні концентрацій, було висунуто припущення, що вплив сумарного препарату ФГА на проліферацію клітин ссавців в умовах *in vitro* може бути результатом спільної дії його окремих ізолектинів – лейкоаглютиніну та еритроаглютиніну, при цьому кінцевий ефект може зумовлюватися як сумарною, так і конкурентною дією цих білків. Порівняння експериментально отриманих та розрахованих даних теоретично очікуваної дії сумарного препарату (рис. 2-4) за умов незалежної адитивної дії обох його ізолектинів, може свідчити на користь припущення про конкурентну взаємодію еритроаглютиніну та лейкоаглютиніну за умов експерименту.

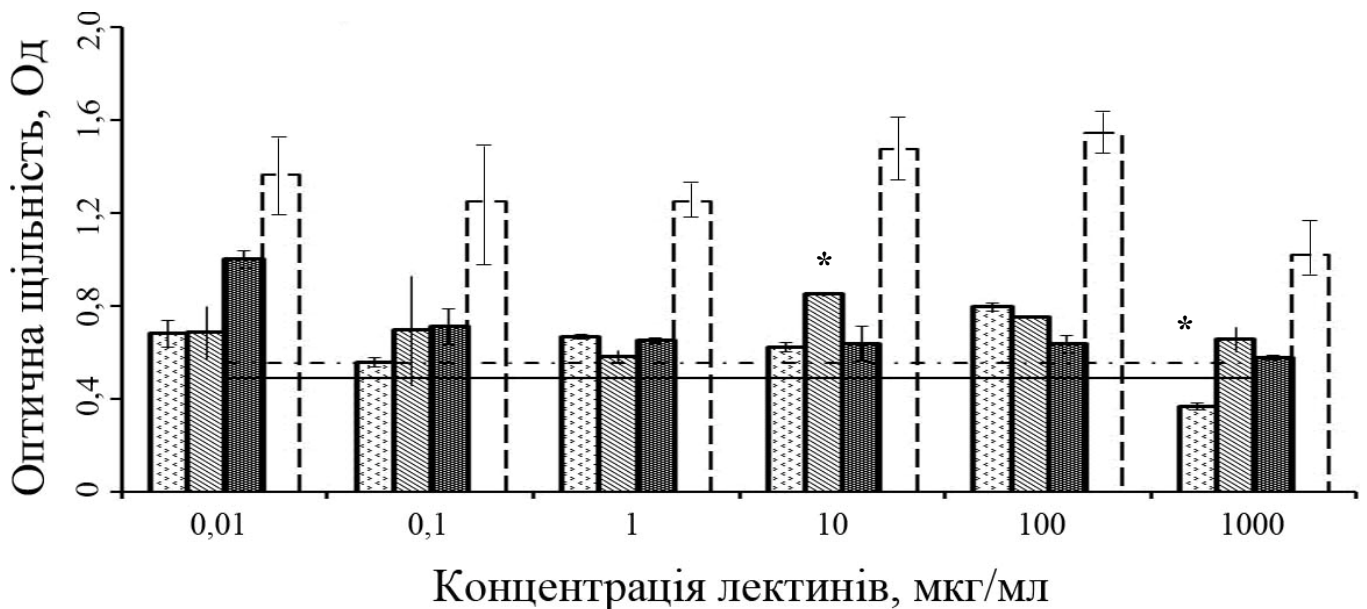


Рис. 2. Вплив сумарного препарату ФГА та його ізолектинів на проліферацію клітин китайського хом'ячка; [шпигунок] – ФГА Л; [шпигунок] – ФГА Е; [чорний квадрат] – ФГА; [двокрапка] – теоретично очікувана дія двох ізолектинів; [пунктирна лінія] – контроль; [суцільна лінія] – ММС; * - достовірна різниця у показниках щодо відповідного контролю ($p \leq 0,05$)

Дійсно можливо, що молекули двох ізолектинів ФГА конкурують за мішені – вуглеводні детермінанти на поверхні клітинної мембрани. Але таке припущення потребує подальших молекулярно-біологічних досліджень. Оскільки при дослідженні впливу лектинів на проліферацію клітин ссавців в умовах *in vitro* спостерігалось статистично достовірне зменшення кількості клітин після їхньої обробки лектинами у високих концентраціях, було зроблено припущення про здатність досліджуваних білків індукувати апоптоз за даних умов експерименту.

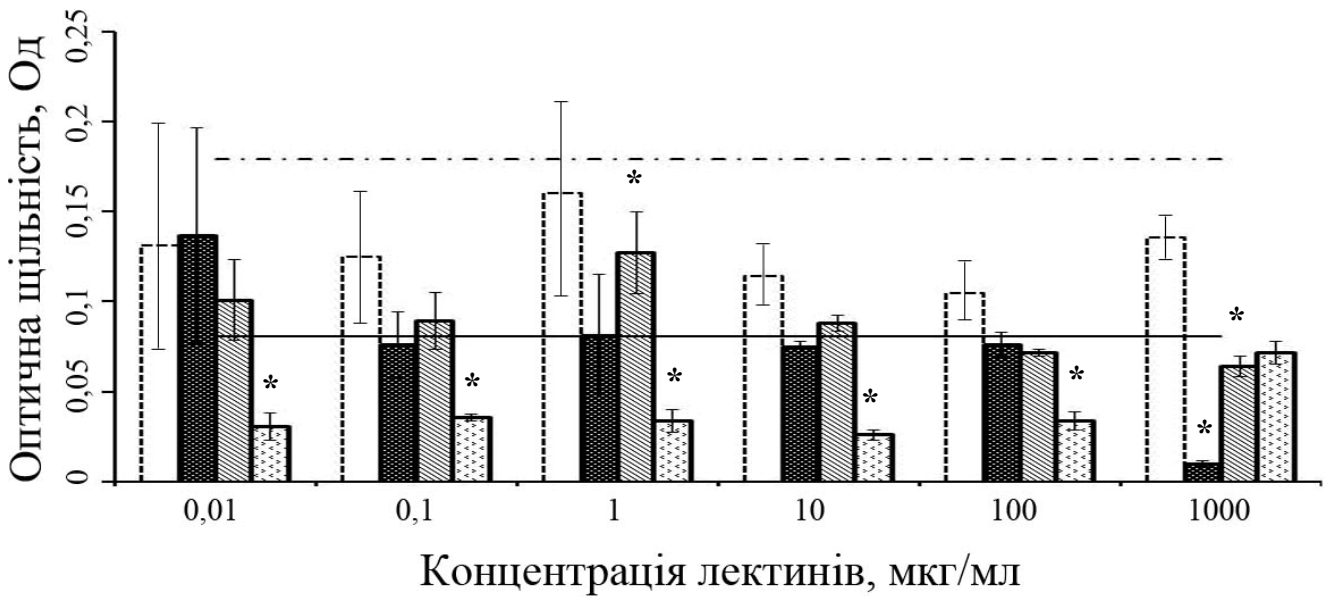


Рис. 3. Вплив сумарного препарату ФГА та його ізолектинів на проліферацію клітин раку гортані Нер-2; ▨ – ФГА Л; ▩ – ФГА Е; ■ – ФГА; ▤ – теоретично очікувана дія двох ізолектинів; - · - - контроль; — - - ММС; * - достовірна різниця у показниках щодо відповідного контролю ($p \leq 0,05$)

Для перевірки цього припущення було проведено серію дослідів з використанням лектинів у концентраціях 1 та 100 мкг/мл. При цьому відносно визначення життєздатності клітин або апоптичний індекс проводилось відразу та через 12 год після обробки.

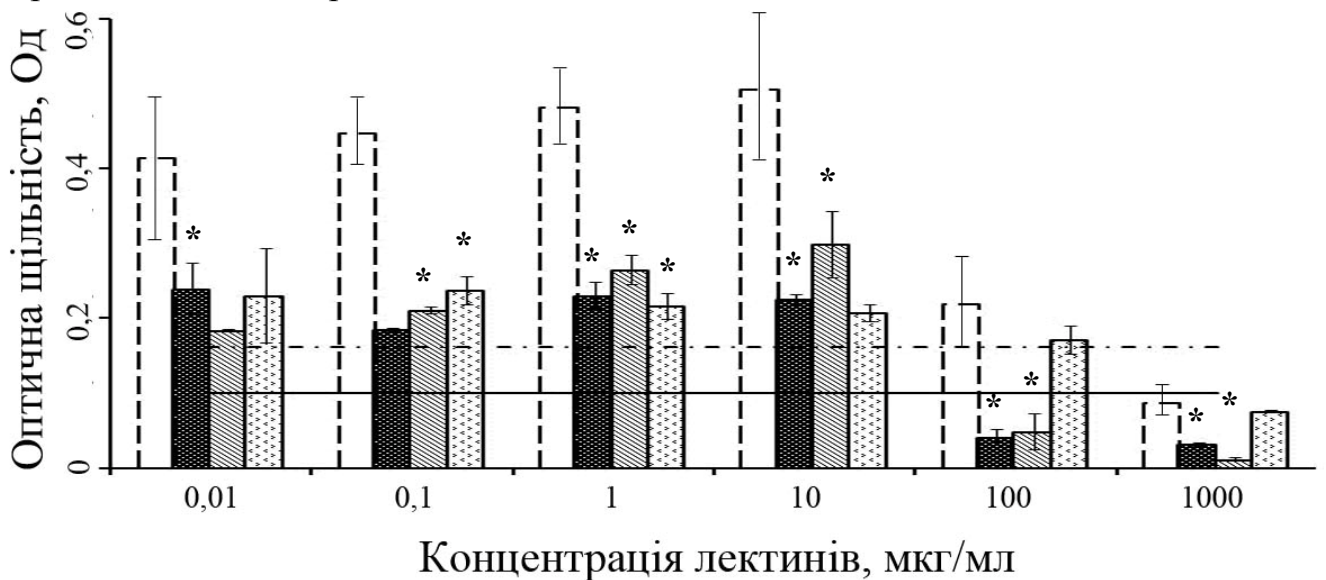


Рис. 4. Вплив сумарного препарату ФГА та його ізолектинів на проліферацію культури клітин 4BL; ▨ – ФГА-Л; ▩ – ФГА-Е; ■ – ФГА; ▤ – теоретично очікувана дія двох ізолектинів; - · - - контроль; — - - ММС; * - достовірна різниця у показниках щодо відповідного контролю ($p \leq 0,05$)

При дослідженні впливу сумарного препарату ФГА та ізолектинів ФГА-Е і ФГА-Л на частоту клітин у апоптозі в культурі при використанні лінії Нер-2 (рис. 5) було показано, що обробка лектинами у концентрації 1мкг/мл призводила до зменшення кількості живих клітин, порівняно з контролем (рис.5, а). Найвища частота апоптичних клітин спостерігалась при дії еритроаглютиніну та становила - 92%. Менш активним індуктором апоптозу в клітинах Нер-2 у цій серії дослідів виявився лейкоаглютинін, так відсоток клітин у апоптозі становив лише - 43 %. За рівнем апоптотичного ефекту сумарний препарат займав проміжне місце порівняно з дією окремих ізолектинів.

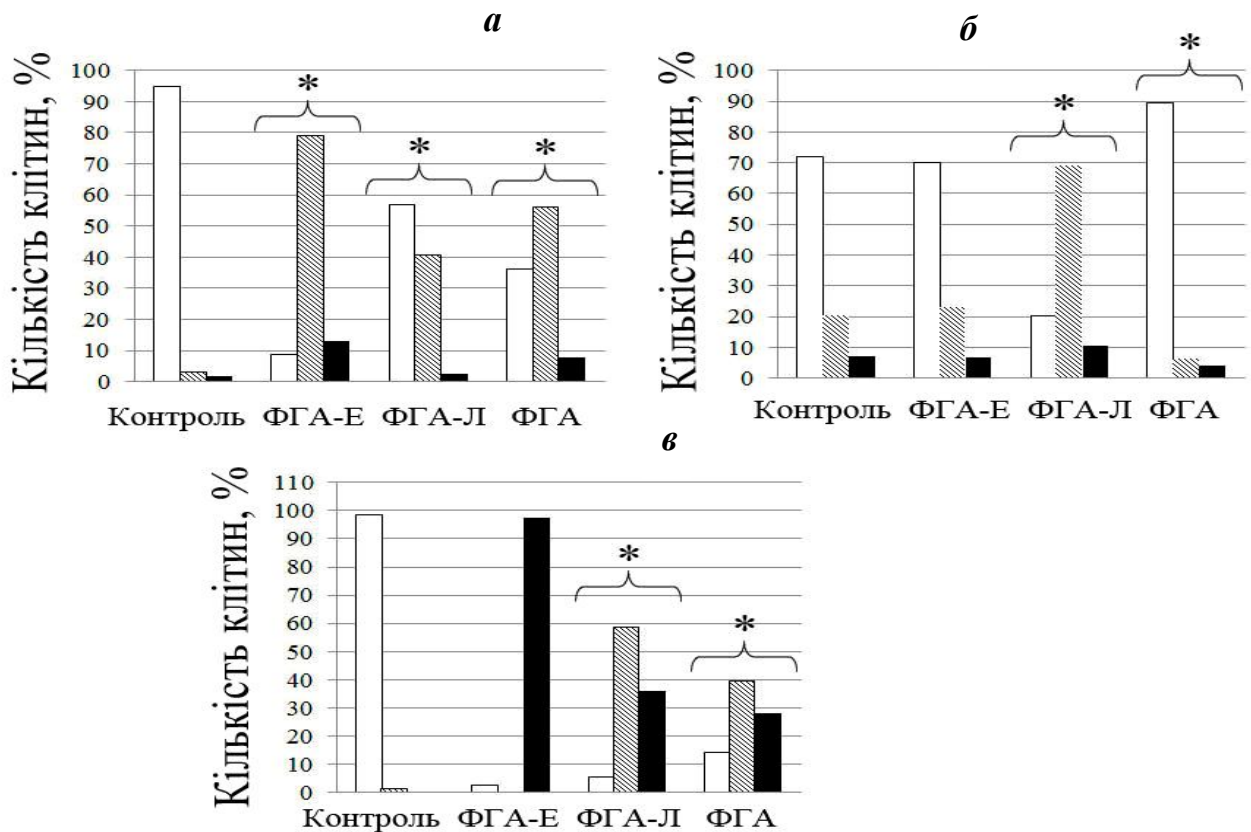


Рис. 5. Індукція апоптозу у культурі клітин Нер-2 сумарним препаратом ФГА та його ізолектинами за умов різних варіантів обробки: *а* – концентрація досліджуваних лектинів становила 1 мкг/мл, підрахунок частоти апоптичних клітин проводили відразу після обробки; *б* – концентрація досліджуваних лектинів становила 1 мкг/мл, підрахунок частоти апоптичних клітин проводили через 12 годин після обробки; *в* – концентрація досліджуваних білків становила 100 мкг/мл, підрахунок частоти апоптичних клітин проводили відразу після обробки. Розподіл частот живих та апоптичних клітин для усіх дослідних варіантів достовірно відрізнявся від контролю (* $p < 0,05$ за критерієм χ^2 , у кожному дослідному варіанті проаналізовано не менше 200 клітин); □ – живі клітини; ▨ – клітини в апоптозі; ■ – мертві клітини

Аналізуючи частоту живих та апоптичних клітин при обробці досліджуваними лектинами у концентрації 1мкг/мл через 12 год після обробки, було з'ясовано, що біологічна активність ізолектинів мала дещо інший характер, порівняно з попереднім дослідом, де використовували мікрокультуральний тест (рис. 5, б). Так, нами не було виявлено статистично достовірних відмінностей між частотами апоптичних клітин у контролі та в культурі клітин, що були оброблені еритроаглютиніном. В той же час, лейкоаглютинін суттєво підвищував частоту апоптичних клітин у експерименті, на відміну від попереднього досліду, де найбільший відсоток апоптичних клітин спричиняла дія еритроаглютиніну (рис. 5, а). Вірогідно ($p < 0,001$) різнився від контрольного також і розподіл частот живих та апоптичних клітин після обробки сумарним препаратом ФГА: кількість живих клітин була навіть вищою, ніж у контролі - 89 %.

Отримані дані узгоджуються з попередніми дослідженнями з використанням мікрокультурального тесту, де вивчали вплив ФГА та його ізолектинів на проліферацію клітин Нер-2 (рис.3), де також досліджували дію білків через 12 год після обробки. При дослідженні впливу сумарного препарату та його ізолектинів концентрації 100 мкг/мл на частоту апоптичних клітин у із використанням тієї ж тест-системи було показано, що обробка усіма трьома препаратами призводить до статистично достовірних ($p < 0,001$) змін розподілу частот живих та апоптичних клітин, підвищуючи частоту апоптичних клітин, порівняно з контролем. У випадку дії ізолектинів відсоток живих клітин був нижчий, а при умові впливу еритроаглютиніну спостерігався найвищий відсоток мертвих клітин порівняно із варіантами обробки лейкоаглютиніном та сумарним препаратом; рівень значущості цих відмінностей також становила $p < 0,001$ (рис. 5).

Варто також зауважити, що на відміну від двох попередніх експериментів, в яких дію білків досліджували при низькій концентрації, у цьому дослідному варіанті спостерігалась і тенденція до зростання частоти мертвих клітин. Таке спостереження свідчить на користь гіпотези про концентраційну залежність при реалізації біологічної дії досліджуваних білків та узгоджується з результатами досліджень впливу білків на проліферацію клітин в умовах *in vitro* (рис. 2).

При індукції апоптозу у культурі китайського хом'ячка показано, що при концентрації 1 мкг/мл сумарний препарат та лейкоаглютинін статистично достовірно ($p < 0,001$) індукували підвищення частоти апоптичних клітин лише одразу після обробки (рис. 6, а). При дослідженні дії білків у концентрації 100 мкг/мл спостерігали статистично достовірне ($p < 0,001$) зниження частоти живих клітин порівняно з контролем (рис. 6, в). Найвищу частоту апоптичних клітин спостерігали при обробці еритроаглютиніном. Також варто зауважити, що серед проаналізованих клітин переважали мертві клітини. Розподіл частот живих та апоптичних клітин відрізнявся від такого у препаратах, оброблених еритроаглютиніном та сумарним ФГА, на рівні значимості $p < 0,001$.

Із використанням культури клітин людини 4BL у якості модельного об'єкту, було показано, що при концентрації білка 1 мкг/мл еритроаглютинін змінював розподіл частот живих та апоптичних клітин (рівень значимості відмінностей

становив $p < 0,001$). При цьому спостерігалось зростання частоти апоптичних клітин як відразу, так і через 12 год після обробки (рис. 7, а, б).

Обробка сумарним препаратом у концентрації 1мкг/мл через 12 год спричиняла лише не значне зменшення кількості живих клітин у культурі, порівняно з контролем, а у культурах, оброблених лейкоаглютиніном, частота живих клітин навіть дещо зростала (рівень значимості відмінностей розподілу частот становив $p < 0,001$).

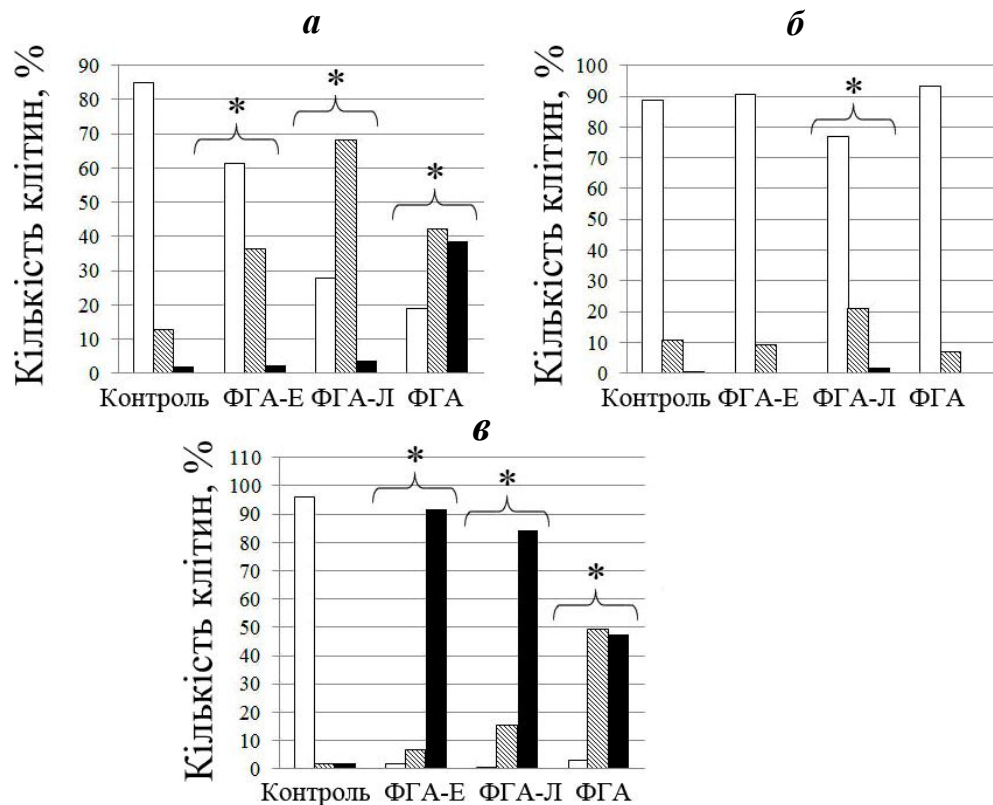


Рис. 6. Індукція апоптозу у культурі клітин китайського хом'ячка сумарним препаратом ФГА та його ізолектинами за умов різних варіантів обробки: а – концентрація досліджуваних лектинів становила 1 мкг/мл, врахування частоти апоптичних клітин проводили відразу після обробки; б – концентрація досліджуваних лектинів становила 1 мкг/мл, врахування частоти апоптичних клітин проводили через 12 годин після обробки; в – концентрація досліджуваних лектинів становила 100 мкг/мл, врахування частоти апоптичних клітин проводили відразу після обробки. Розподіл частот живих та апоптичних клітин для усіх дослідних варіантів достовірно відрізнявся від контролю (* $p < 0,05$ за критерієм χ^2 , у кожному дослідному варіанті проаналізовано не менше 200 клітин); □ – живі клітини; ▨ – клітини в апоптозі; ■ – мертві клітини

При концентрації досліджуваних білків 100 мкг/мл, як і у попередніх дослідах спостерігалась статистично достовірна індукція частоти апоптичних клітин усіма досліджуваними лектинами ($p < 0,001$). Цікаво, що вплив досліджуваних ізолектинів на клітини різного походження *in vitro* дещо різнився. Так, після обробки сумарним ФГА та лейкоаглютиніном в концентрації 1 мкг/мл у культурі клітин китайського хом'ячка спостерігався достовірно вищий рівень апоптозу, ніж в культурі Нер-2; в той же час після обробки еритроаглютиніном спостерігалась цілком протилежна картина.

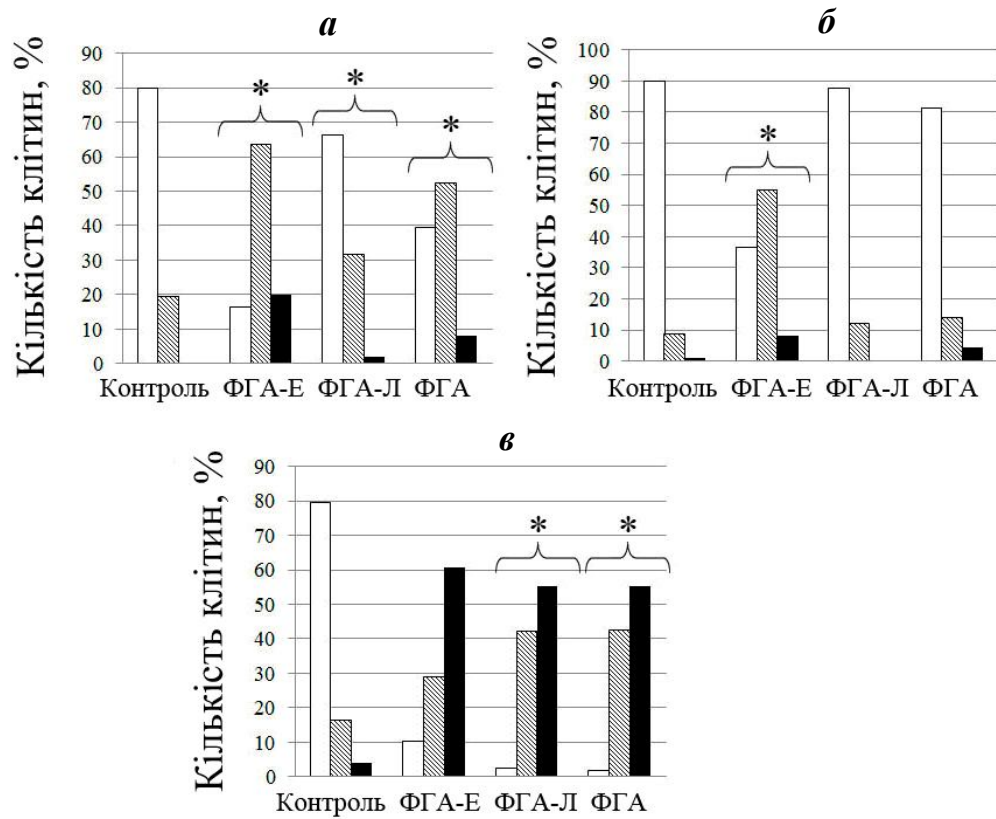


Рис. 7. Індукція апоптозу у культурі клітин 4BL сумарним препаратом ФГА та його ізолектинами за умов різних варіантів обробки: а – концентрація досліджуваних лектинів становила 1 мкг/мл, врахування частоти апоптичних клітин проводили відразу після обробки; б – концентрація досліджуваних лектинів становила 1 мкг/мл, врахування частоти апоптичних клітин проводили через 12 годин після обробки; в – концентрація досліджуваних лектинів становила 100 мкг/мл, врахування частоти апоптичних клітин проводили відразу після обробки. Розподіл частот живих та апоптичних клітин для усіх дослідних варіантів достовірно відрізнявся від контролю (* $p < 0,05$ за критерієм χ^2 , у кожному дослідному варіанті проаналізовано не менше 200 клітин); □ – живі клітини; ▨ – клітини в апоптозі; ■ – мертві клітини

Отже отримані дані можуть свідчити про вплив досліджених лектинів на апоптоз у культурі клітин ссавців, а також про їхній дозозалежний вплив на

проліферацію. При низьких концентраціях спостерігалась переважно, або мітогенна активність лектинів, або відсутність індукції апоптозу, окрім дії лейкоаглютиніну у культурі клітин раку гортані Нер-2 (рис. 2). Цікаво також, що відсоток апоптичних клітин одразу після обробки лектинами у концентрації 1 мкг/мл був іноді вищий, ніж через 12 год після обробки. Оскільки більша частина клітин у цьому випадку перебувала у апоптозі, такий ефект можна пояснити тим, що певна частина цих клітин активно репарується та проліферує. Це вказує на складні молекулярно-біологічні механізми реалізації дії лектинів та потребує подальших досліджень.

Дослідження молекулярних механізмів індукції апоптозу клітин ссавців сумарним препаратом ФГА та його окремими ізолектинами. Зважаючи на існуючі літературні дані стосовно здатності лектинів ініціювати апоптоз та аутофагію клітин через вплив на чисельні сигнально-регуляторні механізми, та отримані дані, було зроблено припущення, що лектини ФГА здатні також ініціювати певні сигнальні каскади апоптозу. Для виявлення такого ефекту було проаналізовано зміни рівня експресії медіаторів апоптозу у клітинах ссавців після дії досліджуваних лектинів. На цьому етапі роботи увагу було зосереджено на вивченні змін рівнів експресії активованих каспаз 3 та 8, а також про- та антиапоптичного білка – Вах та Bcl2, відповідно. У досліді було вивчено дію лектинів у концентрації 1 мкг/мл, оскільки при цій концентрації спостерігався ефект індукції апоптозу в усіх досліджуваних тест-системах (рис. 5-7), і при цьому саме така концентрація є найближчою до фізіологічних значень. Як позитивний контроль, при проведенні цієї серії експериментів, використовували МННГ, що є відомим індуктором апоптозу, проте його дія опосередкована не через каспазний каскад, а через каспазозалежний механізм із залученням AIF-білка (Dunkern et al., 2003; Roos et al., 2004).

За допомогою Вестерн-блот аналізу виявлено, що як сумарний препарат, так і його окремі ізолектини спричиняли підвищення рівня експресії проапоптичних білків у клітинах пухлинного і непухлинного походження (рис. 8 та 9). Однак, ефект дії лектинів дещо відрізнявся для різних тест-систем. Показано що, обробка еритроаглютиніном клітин 4BL призводить до значного підвищення вмісту активованих каспази-3 (приблизно у 10 разів) та каспази-8 (більш ніж у 10 разів) порівняно із контролем (рис. 8). Одночасно з цим, вміст цих активованих каспаз більш ніж у 2 рази перевищував такі показники, що були отримані після обробки клітин лейкоаглютиніном (рис. 8). Такі дані узгоджуються з результатами, отриманими при цитологічному дослідженні впливу лектинів ФГА на частоту апоптичних клітин у культурі 4BL (рис. 7). Варто зауважити, що за умов експерименту, саме дія еритроаглютиніну призводила до значного підвищення порівняно з контролем відсотку апоптичних та мертвих клітин у досліджуваній культурі (рис. 7).

Також було проаналізовано зміни рівня експресії білка Вах у клітинах культури 4BL після обробки їх лектинами. У результаті було виявлено, що під впливом усіх досліджуваних лектинів відбувається підвищення рівня цього білка стосовно контролю (рис. 8. в). При цьому найвищий вміст білка Вах (приблизно у 5 разів порівняно з контролем) спостерігали після обробки клітин еритроаглютиніном.

Це може свідчити про більш виражений проапоптичний ефект цього ізолектину порівняно з ФГА і ФГА-Л, та його здатність індукувати як рецептор-залежний так і мітохондріальний шляхи апоптозу. Найменш виражений індукуючий ефект серед досліджених лектинів мав ФГА-Л, але при цьому рівень експресії білка Вах у клітинах був значно вищим (більш ніж у 2 рази) порівняно із контролем (рис. 8).

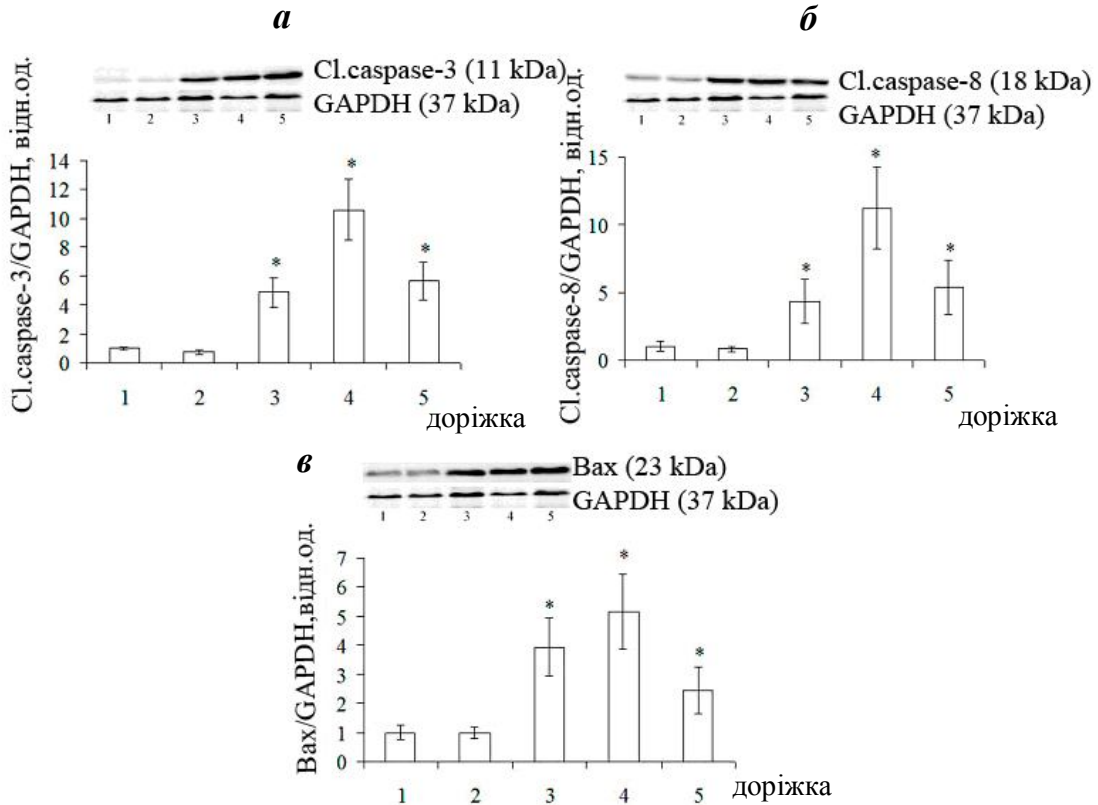


Рис. 8. Активація медіаторів апоптозу на рівні білка сумарним препаратом ФГА та його окремими ізолектинами (1 мкг/мл) у культурі клітин 4ВL. Тривалість обробки становила 4 години. Кількісні зміни рівня експресії білка обраховували відносно GAPDH: *а* – розщепленої каспази-3; *б* – розщепленої каспази-8; *в* – білка Вах; MNNG – N-метил-N'-нітро-N-нітрозогуанідин, ФГА-Е – еритроаглютинін, ФГА-Л – лейкоаглютинін, ФГА – сумарний препарат фітогемаглютиніну, GAPDH- гліцеральдегід-фосфат-дегідрогеназа; 1 - контроль, 2 - MNNG, 3 – ФГА, 4 – ФГА-Е, 5 – ФГА-Л; * - достовірна різниця у показниках щодо відповідного контролю ($p \leq 0,05$ $n=3$)

У культурі клітин Нер-2, аналогічно із попередньою тест системою, найактивнішим індуктором каспази-3 виявився еритроаглютинін: вміст розщепленої каспази-3 був у 4 рази вищим порівняно із контролем і майже вдвічі більший порівняно із дією двох інших білків (рис. 9, а). Ці дані узгоджуються із результатами кількісного аналізу розподілу клітин на після дії лектинів (рис. 5, а). У цій серії експериментів, саме через 4 год після обробки лектинами, також спостерігався найвищий відсоток апоптичних клітин саме після дії еритроаглютиніну. Цікаво, що найвищий вміст розщепленої форми ініціаторної каспази-8 було виявлено після

обробки клітин Нер-2 не еритроаглютиніном, а сумарним препаратом ФГА (рис. 9, б). Еритроаглютинін та лейкоаглютинін також індукували підвищення вмісту цієї каспази у культурі клітин Нер-2 приблизно у 4 рази порівняно із контролем, проте ці значення були майже вдвічі нижчими порівняно із такими після дії сумарного ФГА (рис. 9, б).

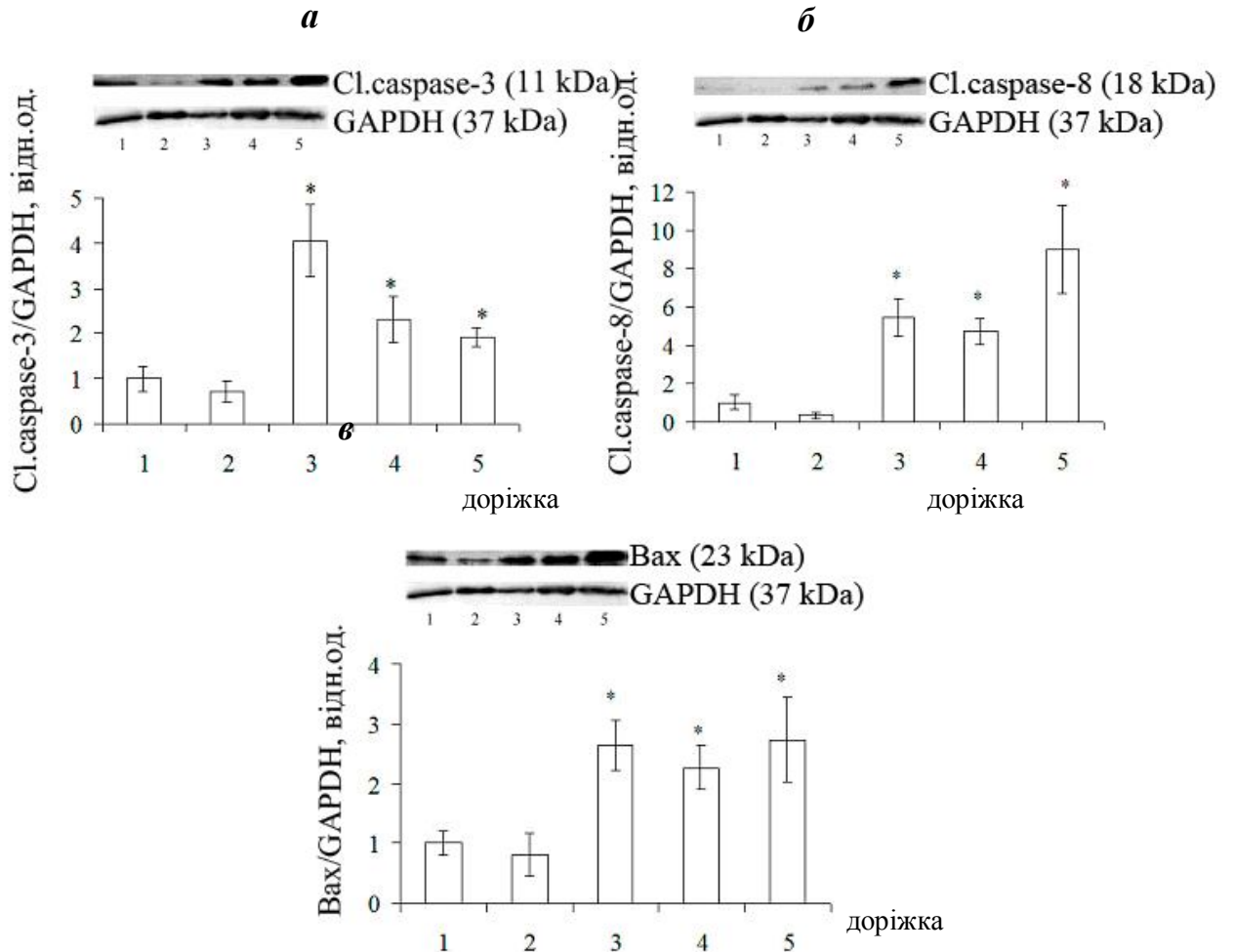


Рис. 9. Активація медіаторів апоптозу на рівні білка сумарним препаратом ФГА та його окремими ізолектинами (1 мкг/мл) у культурі клітин Нер-2. Тривалість обробки становила 4 години. Кількісні зміни рівня експресії білка обраховували відносно GAPDH: *а* - розщепленої каспази-3; *б* - розщепленої каспази-8; *в* - білка Вах; MNNG - N-метил-N'-нітро-N-нітрозогуанідин, ФГА-Е - еритроаглютинін, ФГА-Л - лейкоаглютинін, ФГА сумарний препарат фітогемаглютиніну, GAPDH- гліцеральдегід-фосфат-дегідрогеназа; 1 - контроль, 2 - MNNG, 3 - ФГА-Е, 4 - ФГА-Л, 5 - ФГА; * - достовірна різниця у показниках щодо відповідного контролю ($p \leq 0,05$ $n=3$)

Аналіз змін вмісту проапоптичного білка Вах виявив, що так як і у клітинах не пухлинного походження (рис. 8, в) у культурі клітин Нер-2 усі досліджувані лектини спричиняли підвищення вмісту білка Вах, але такий ефект був менш вираженим, вміст білка збільшувався у 1,5 раза порівняно із контролем (рис. 9, в). Сумарний

препарат ФГА та еритроаглютинін підвищували вміст білка Вах на одному рівні, дещо нижчим такий рівень був після дії лейкоаглютиніну (рис.9, в).

Отже, усі досліджені лектини здатні підвищувати вміст активованих каспаз 3 та 8 і проапоптичного білка Вах у злоякісних та умовно нормальних клітинах ссавців в умовах *in vitro*. Отримані дані узгоджуються із даними літератури щодо здатності цілої низки лектинів як рослинного, так і тваринного походження ініціювати апоптоз через активацію мітохондріального та/або рецептор-залежного шляхів (Антонюк, 2005). Однак, стосовно ФГА така дія не була показана, лише нещодавно, фактично одночасно із нашою роботою, було показано, що один з ізолектинів – еритроаглютинін може спричиняти апоптоз у клітинах раку легень людини ініціюючи мітохондріальний сигнальний каскад (Kuo et al., 2011).

Із застосуванням ПЛР у реальному часі було показано, що усі три досліджувані лектини спричиняли статистично достовірне підвищення експресії проапоптичного гена *Vax* у культурі клітин раку гортані людини порівняно з контролем. Отримані дані цілком узгоджуються із результатами Вестерн-блот аналізу (рис. 8, 9). Загалом, рівень експресії гена *Vax* був більш ніж у два рази вищий після дії сумарного препарату ФГА та лейкоаглютиніну і більше ніж у тричі вищий після обробки клітин Нер-2 еритроаглютиніном порівняно із контролем (рис. 10).

Аналізуючи зміни рівня експресії проапоптичного гена *Vax* у культурі клітин 4ВL також виявлено суттєве підвищення (більш ніж у 6 разів) рівня його експресії після обробки клітин еритроаглютиніном та лейкоаглютиніном (рис. 11). Ці дані узгоджуються із результатами Вестерн-блот аналізу (рис. 8, в), де спостерігалось суттєве підвищення рівня експресії білка. Однак не вдалося зареєструвати змін експресії цього гена у культурі клітин 4ВL після дії сумарного препарату ФГА (рис. 11). Це може бути пояснено, зокрема, порушенням або затримкою протеасомної деградації білка Вах саме при дії сумарного препарату ФГА.

Із застосуванням ПЛР у реальному часі також проаналізовано вплив досліджуваних лектинів на рівень експресії антиапоптичного гена *Bcl2*. Варто зауважити, що при обробці клітин культур Нер-2 та 4ВL як сумарним препаратом ФГА, так і його окремими ізолектинами не спостерігалось статистично достовірного підвищення експресії гена *Bcl-2* (рис. 10,11).

В усіх експериментах рівень експресії цього гена лишався на рівні з контролем і лише у випадку обробки клітин лінії 4ВL еритроаглютиніном рівень експресії гена *Bcl-2* статистично достовірно знижувався порівняно із іншими варіантами у досліді (рис. 11).

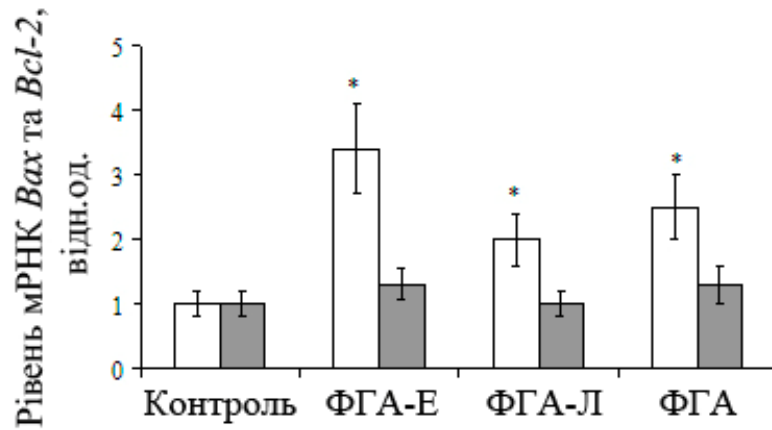


Рис.10. Експресія генів *Bax* та *Bcl-2* в клітинах Hep-2 після обробки лектинами (рівень мРНК за даними ПЛР у реальному часі). *Достовірна різниця у показниках щодо відповідного контролю ($p \leq 0,05$, $n=3$); □ – *Bax*; ■ – *Bcl-2*; ФГА-Е - еритроаглютинін, ФГА-Л – лейкоаглютинін, ФГА сумарний препарат фітогемаглютиніну

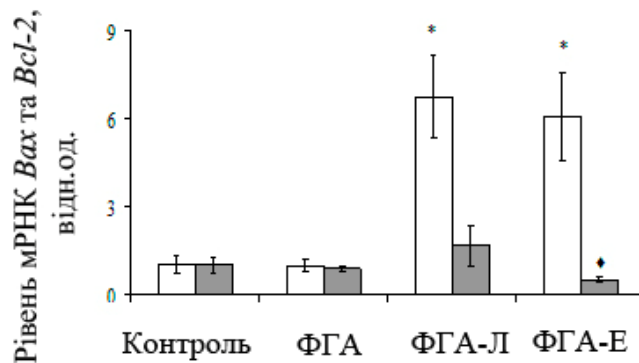


Рис. 11. Експресія генів *Bax* та *Bcl-2* в клітинах 4VL після обробки лектинами (рівень мРНК за даними ПЛР у реальному часі). Достовірна різниця у показниках щодо відповідного контролю :* для *Bax*, [♦] для *Bcl-2*. ($p \leq 0,05$, $n=3$); □ – *Bax*; ■ – *Bcl-2*; ФГА-Е - еритроаглютинін, ФГА-Л – лейкоаглютинін, ФГА сумарний препарат фітогемаглютиніну

Молекулярне моделювання білок-білкової взаємодії лейкоаглютиніну з про-та антиапоптотичними рецепторами клітинної мембрани. Вуглевод-білкові взаємодії є основним із механізмів реалізації біологічної активності лектинів. Виходячи з отриманих даних можна уявити, що у реалізації проапоптотичної дії лектинів беруть участь не лише вуглевод-білкові взаємодії, а й білок-білкові взаємодії лектинів та рецепторів, що контролюють клітинний цикл та апоптоз. Отже для перевірки цього припущення було проведено молекулярне моделювання можливих взаємодій лектинів ФГА та рецепторів клітинної мембрани залучених до контролю проліферації та апоптозу. Для цього було застосовано метод докінг

аналізу, при проведенні якого використовували 3D структури із бази даних Protein Data Bank (<http://www.rcsb.org>). У результаті проведеного аналізу було отримано оптимальні просторові структури комплексів лейко аглютиніну як з проапоптичними рецепторами (FasR і TNF1R), так і антиапоптичними рецепторами (IGF1R та EGFR) клітини (рис. 12).

Варто зауважити, що усі змодельовані комплекси характеризуються високою енергією зв'язування ($-\Delta G_{\text{Gibbs}}$) і це свідчить про можливу специфічність зв'язування лейкоаглютиніну як з про- так і з антиапоптичними рецепторами (табл. 1).

Таблиця 1

Енергія зв'язування лейкоаглютиніну у комплексах із про – та антиапоптичними рецепторами

Рецептор	Енергія зв'язування, $-\Delta G_{\text{Gibbs}}$, kJ/mole
FasR	620,0
TNF1R	863,8
IGF1R	567,4
EGFR	609,4

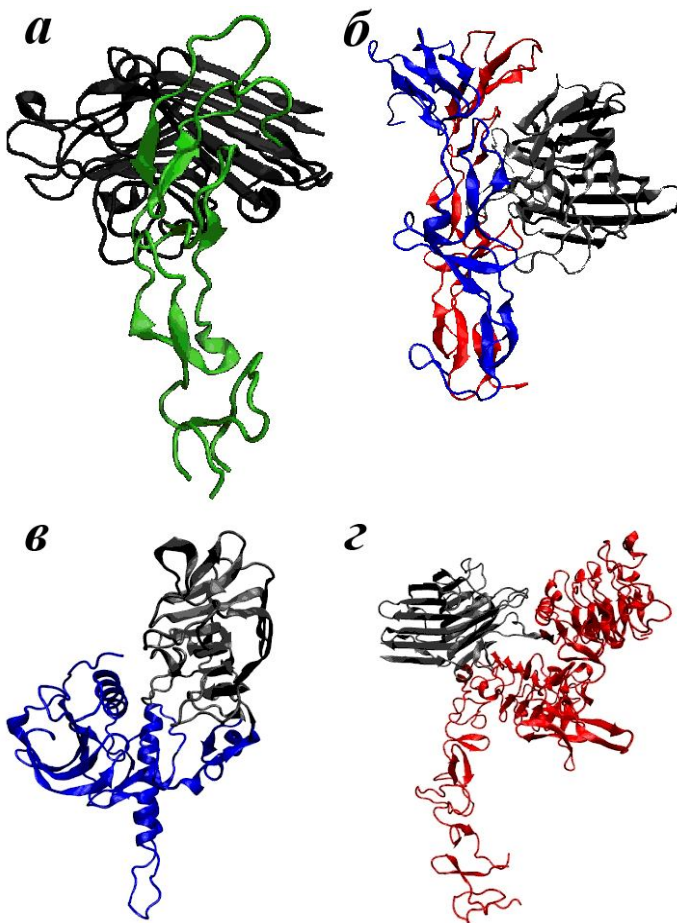


Рис. 12. Комплекси лейкоаглютиніну (ФГА-Л) з рецепторами: *a* – FasR (структуру рецептору позначено зеленим); *б* – TNF1R (позначено синім та червоним); *в* – IGF1R (позначено синім); *г* – EGFR (позначено червоним); структуру ФГА-Л зображено чорним кольором

ВИСНОВКИ

Виявлено здатність сумарного препарату фітогемаглютиніну та його окремих ізолектинів індукувати загибель злоякісних і умовно нормальних соматичних клітин ссавців опосередковано через ініціацію рецептор-залежного механізму апоптозу.

1. Встановлено, що ФГА та його ізолектини у концентрації 1 мкг/мл спричиняли типові для апоптозу зміни морфології ядра через 4 години після обробки.

2. Показано, що сумарний препарат ФГА та його окремі ізолектини мають дозозалежний характер впливу на проліферацію та виживання клітин. У діапазоні високих концентрацій (100 – 1000 мкг/мл) лектини інгібували ріст клітинної культури.

3. Вперше виявлено підвищення рівня активованих каспаз 3 та 8 у культурах клітин карциноми гортані та клітинах непухлинного походження людини під дією ФГА та його окремих ізолектинів, причому найбільш ефективним індуктором каспаз виявився еритроаглютинін.

4. Показано здатність ФГА та його ізолектинів спричиняти програмовану загибель клітин, регулюючи експресію про- та антиапоптичних білків Вах і Bcl-2 на рівні РНК та білка.

5. Із застосуванням комп'ютерних методів аналізу було виявлено специфічні білок-білкові комплекси, які лейкоаглютинін здатен утворювати як з проапоптичними рецепторами (FasR та TNF1R), так і антиапоптичними рецепторами (IGF1R і EGFR) клітини.

ПЕРЕЛІК НАУКОВИХ ПРАЦЬ, ОПУБЛІКОВАНИХ ЗА ТЕМОЮ ДИСЕРТАЦІЇ

1. *Кочубей Т.О.* Дослідження впливу сумарного препарату ФГА та його субодиниць на проліферацію, виживання та апоптоз клітин різного видового походження в умовах *in vitro* / Т.О. Кочубей, О.О. Півень, І.С. Карпова, Л.Л. Лукаш // Збірник наукових праць "Актуальні проблеми акушерства і гінекології, клінічної імунології та медичної генетики". – 2010. – Вип.19. – С. 250 – 257. *Особистий внесок здобувача: ведення культур клітин, постановка мікрокультурального тесту, забарвлення клітин акридиновим помаранчевим та етидіумом бромідом, аналіз клітинних препаратів.*
2. *Кочубей Т.О.* Індукція апоптичних змін у культурах клітин ссавців сумарним препаратом ФГА та його ізоформами / Т.О. Кочубей, О.О. Півень, В.І. Андрієнко, І.С. Карпова, Л.Л. Лукаш // Фактори експериментальної еволюції організмів. – 2010. – Т. 9. – С.161 – 165. *Особистий внесок здобувача: ведення та обробка культур клітин, проведення мікрокультурального тесту, забарвлення клітин акридиновим помаранчевим та етидіумом бромідом, мікроскопічний аналіз препаратів.*
3. *Кочубей Т.О.* Вплив Фітогемаглютиніну *Phaseolus vulgaris* та його ізоформ на проліферацію та виживання клітин ссавців *in vitro* / Т.О. Кочубей, О.О.Півень, В.І. Андрієнко, Л.Л. Мацевич, І.С. Карпова, Л.Л. Лукаш // Вісн. Укр. тов-ва генетиків і селекціонерів. – 2012 – Т. 10, № 1. – С. 42 – 50. *Особистий внесок*

здобувача: культуральна робота, мікрокультуральний тест, забарвлення клітин акридиним помаранчевим та етидіумом бромідом, мікроскопічний аналіз препаратів.

4. Кочубей Т.О. Ізоформи фітогемаглютиніну як індуктори апоптозу пухлинних клітин *in vitro* / Т.О. Кочубей, О.В. Максимчук, Л.Л. Мацевич, О.О. Півень, Л.Л. Лукаш // Вісн. Укр. тов-ва генетиків і селекціонерів. – 2013.– Т.11, № 2. – С. 226–233. *Особистий внесок здобувача: культивування та обробка клітин лектинами, відилення білка, Вестерн блот аналіз.*
5. Кочубей Т.О. Проапоптичні властивості сумарного препарату фітогемаглютиніну та його окремих ізолектинів у культурі клітин людини 4BL / Т.О. Кочубей, О.В. Максимчук, Л.Л. Мацевич, О.О. Півень, Л.Л. Лукаш // Ukr Biochem J. – 2014. – Т. 86, № 4. – С. 103-109. *Особистий внесок здобувача: культуральна робота, виділено білок, проведено Вестерн блот аналіз, підготовка та аналіз цитологічних препаратів.*
6. Kochubei T.O. Isolectins of phytohemagglutinin are able to induce apoptosis in HEP-2 carcinoma cells *in vitro* / T.O. Kochubei, O.V. Maksymchuk, O.O. Piven, L.L. Lukash // Exp Oncol. – 2015. – Vol.37, N2. – P.116–119. *Особистий внесок здобувача: культуральна робота, виділено білок, проведено Вестерн блот аналіз, виділено РНК, синтезовано кДНК та проведено аналіз змін рівня експресії генів Вах, Bcl-2.*
7. Kochubei T.O. Lectins as mediators of normal and cancer cell proliferation and apoptosis / T.O. Kochubei, O.O. Piven, I.S. Karpova, L.L. Lukash // 44nd Annual Scientific Meeting of the European Society for Clinical Investigation. – February 24-27, 2010, Bari, Italy. – Book of abstracts. – Vol.40, suppl.1, – P. 59. *Особистий внесок здобувача: культивування та обробка клітин, постановка мікрокультурального тесту.*
8. Т.О. Кочубей, Порівняльний аналіз впливу лектину квасолі звичайної (*Phaseolus vulgaris*) на різні тест-системи / Т.О. Кочубей, О.О. Півень, І.С. Карпова, Л.Л. Лукаш // Матеріали конференції "Перспективи розвитку лісового та садово-паркового господарства", Умань, 18-20 квітня 2010р. – С.66 – 67. *Особистий внесок здобувача: культивування та обробка клітин, мікрокультуральний тест, аналіз зміни морфології ядра клітин.*
9. Kochubei T.O. The influence of lectins on normal and cancer mammalian cell proliferation / T.O. Kochubei, O.O. Piven, I.S. Karpova, L.L. Lukash // FEBS / SFRRE / IUBMB Advanced Lecture Course Protein maintenance and turnover in ageing & diseases. – Spetses Iceland, Greece, 4-10 June, 2010. – P.59. *Особистий внесок здобувача: культивування та обробка клітин лектинами, постановка мікрокультурального тесту.*
10. Kochubei T. Comparison of biological activity of lectin PHA and its isoforms on bacterial and human cells / T. Kochubei, O. Piven, I. Karpova, L. Lukash // Polish-Ukrainian Weigl Conference „From microbiology to synthetic biology”, 18-20 May, 2011, Wroclaw, Poland. – Abstracts Sepsis. – 2011. – Vol. 4, N1. – P.114 – 115. *Особистий внесок здобувача: культивування та обробка клітин, мікрокультуральний тест.*
11. Kochubei T. PHA lectins and its isoforms as a modulator of mammalian cells apoptosis / T. Kochubei, O. Piven, V. Andrienko, I. Karpova, L. Lukash // The 26th European Cytoskeletal Forum (ECF) Meeting „Actin-Based Motility: From Molecules to Model Organisms”, 28 October– 2 November, Stresa-Lake Maggiore, Italy, 2011 – P.97. *Особистий внесок здобувача: культивування та обробка клітин лектинами, відилення білка, Вестерн блот аналіз.*

12. Kochubei T. Lectin phytohemagglutinin and its isoforms as modulators of the proliferation and apoptosis on human cancer cells in vitro / T. Kochubei, O. Piven, V. Andrienko, L. Lukash // Single Cell Physiology International EMBO workshop.- Paris, France, 23-28 July 2012. *Особистий внесок здобувача: культивування та обробка клітин лектинами, віділення білка, Вестерн блот аналіз.*
13. Kochubei T. Influence of phytohemagglutinin and its isolectins on the proliferation and apoptosis of human's cancer cells / T. Kochubei, O. Piven, V. Andrienko, I. Karpova, L. Lukash // Materials of International Symposium on Cell Biology jointly with 3th Ukrainian Congress for Cell Biology, 16-20 травня, 2012, Лівадія-Ялта, Україна, С. 89. *Особистий внесок здобувача: культивування та обробка клітин лектинами, віділення білка, Вестерн блот аналіз.*
14. Kochubei T.O. Apoptosis-dependent cell death in tumor cells induced by phytohemagglutinin / T.O. Kochubei, O.O. Piven, L.L. Lukash // A joint event: IV Annual IMPPC Conference 1st ICO-IDIBELL Hereditary and Familial Cancer In The Personal Genomics Era. – Barselona, Spain, 14-15 March 2013. – P.82. *Особистий внесок здобувача: культуральна робота, виділено білок, проведено Вестерн блот аналіз, підготовка та аналіз цитологічних препаратів.*
15. Kochubei T. Investigation of proapoptotic activity of phytohemagglutinin and its individual isolectins in human cell culture / Kochubei T., Piven O., Lukash L. // Materials of International Symposium on Cell Biology jointly with 4th Ukrainian Congress for Cell Biology, 17-20 вересня, 2014, Ужгород, Україна, С. 114. *Особистий внесок здобувача: культивування та обробка клітин лектинами, віділення білка, Вестерн блот аналіз.*
16. Kochubei T. Possible mechanisms of leucoagglutinin induced apoptosis in human cells in vitro / Kochubei T., Kitam V., Maksymchuk O., Piven O., Lukash L. // Materials of International Symposium on Cell Biology jointly with 5th Ukrainian Congress for Cell Biology, 2-6 жовтня, 2016, Одеса, Україна, С.10. *Особистий внесок здобувача: культуральна робота, виділено білок, проведено Вестерн блот аналіз, виділено РНК, синтезовано кДНК та проведено аналіз змін рівня експресії генів Вах, Vcl-2.*

АНОТАЦІЯ

Кочубей Т.О. Вплив фітогемааглютиніну і його ізолектинів на життєздатність та апоптоз соматичних клітин ссавців *in vitro*. – Рукопис.

Дисертація на здобуття наукового ступеня кандидата біологічних наук за спеціальністю 03.00.03 – молекулярна біологія. – Інститут молекулярної біології та генетики НАН України, Київ, 2017.

Дисертацію присвячено дослідженню впливу ізолектинів ФГА на виживання та апоптоз соматичних клітин ссавців *in vitro*. Виявлено залежну від концентрації здатність сумарного препарату фітогемааглютиніну та його окремих ізолектинів індукувати загибель соматичних клітин ссавців опосередковано через ініціацію рецептор-залежного механізму апоптозу. Вперше виявлено підвищення рівня активованих каспаз 3 та 8 у культурах клітин раку гортані та клітинах людини непухлинного походження під дією сумарного препарату ФГА та його окремих ізолектинів та показано здатність досліджуваних препаратів модулювати експресію про- і анти апоптичних білків Вах і Bcl2 на рівні білка та РНК. Із застосуванням комп'ютерних методів аналізу нами вперше було передбачено, що лейкоаглютинін здатен утворювати специфічні білок-білкові комплекси як з про-, так і антиапоптичними рецепторами клітини.

Ключові слова: лектини, культура клітин, фітогемааглютинін, ізолектини, апоптоз, виживання, каспази, Вах, Bcl-2, докінг.

АННОТАЦИЯ

Кочубей Т.А. Влияние фитогемагглютинина и его изолектинов на выживание и апоптоз соматических клеток млекопитающих *in vitro*. – Рукопись.

Диссертация на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.00.03. – молекулярная биология. – Институт молекулярной биологии и генетики НАН Украины, Киев, 2017.

Диссертация посвящена исследованию влияния изолектинов ФГА на выживание и апоптоз соматических клеток млекопитающих *in vitro*. Обнаружена зависимость от концентрации способность суммарного препарата фитогемагглютинина и его отдельных изолектинов индуцировать гибель соматических клеток млекопитающих опосредованно через инициацию каспазозависимого механизма апоптоза. Впервые выявлено повышение уровня активированных каспаз 3 и 8 в культурах клеток рака гортани и клетках человека неопухолевого происхождения под действием суммарного препарата ФГА и его отдельных изолектинов и показана способность исследуемых препаратов модулировать экспрессию про- и анти апоптичных белков Вах и Bcl2 на уровне белка и РНК. С применением компьютерных методов анализа нами впервые было предусмотрено, что лейкоагглютинин способен образовывать специфические белок-белковые комплексы как с про-, так и антиапоптичными рецепторами клетки.

Ключевые слова: лектины, культура клеток, изолектины, апоптоз, выживание, каспаз, Вах, Bcl-2, докинг.

SUMMARY

Kochubei T.O. The influence of phytohemagglutinin and its isolectins on somatic cells survival and apoptosis *in vitro*. – Manuscript.

Thesis for Philosophy Doctor (PhD) degree in biology, specialty 03.00.03. – molecular biology. – Institute of Molecular Biology and Genetics, National Academy of Sciences of Ukraine, Kyiv, 2017.

Lectins are highly specific proteins that bind to carbohydrates and are found in many plants, animals, and bacteria. Phytohaemagglutinin (PHA) is the lectin of kidney beans (*Phaseolus vulgaris*) and it is one of the most common and widely studied lectins. Mitogenic activity of PHA is known since 60th of the XX century. This lectin has a tetrameric molecular structure, namely PHA is a mixture of different isolectins, including erythroagglutinin (PHA-E) and leukoagglutinin (PHA-L). However, proapoptotic mechanisms of PHA and its isolectins activity still remain unclear and should be elucidated. In this study we addressed to analyze the influence of PHA and its isolectins on apoptosis in cultivated cells *in vitro* and to clarify possible signalling pathways endorsed by lectins activity.

In our study we have analyzed the influence of the commercial preparation of *P. vulgaris* lectins, mainly PHA, PHA-E and PHA-L. We have used three different mammalian cell lines as a test system. The frequency of live, dead and apoptotic cells has been analyzed using acridine orange and ethidium bromide staining. The changes of caspase-3, caspase-8 and Bax have been inspected by Western blot analysis. Gene expression was analysed using real-time PCR. For protein-protein docking analyses we used 3D structures obtained from Protein Data Bank.

It was shown the significant influence of all lectins have been studied on cell culture proliferation in concentration-dependent manner. In non-tumor 4BL cell line all isolectines have been studied were shown to enhance the cell culture growth in concentration 0,01-10 ug/ml; and in concentration 100< ug/ml the inhibition of culture growth was observed. In malignant Hep-2 cell line the mitogenic properties of PHA isolectines was much less displayed then in 4BL cells, and PHA-L was shown to be cytotoxic even in minimal concentration has been studied (0,01 ug/ml). The influence of total PHA preparation differs significantly from theoretically calculated synergic interaction. Apoptosis induction by total PHA preparation and its isolectins in cell cultures of tumour and non-tumour origin under the experimental conditions was demonstrated too in all concentrations of all isolectines have been studied. The differences between pro-apoptotic effect of PHA isolectines in tumour and non-tumour human cell was discovered in prolonged studies. Thus, in non-tumor 4BL cells the PHA-E was shown to cause the severe apoptotic changes in cell population, whereas in carcinoma Hep-2 cells the massive apoptotic damage was discovered in PHA-L-treated cell population after 12 h of postincubation. Chinese hamster cells were shown to be more resistant to PHA-induced apoptotic damage in all experimental conditions have been studied. It was shown that both total PHA preparation and PHA isolectins induces the cell apoptosis due to caspase-3, caspase-8 and pro-apoptotic Bax protein induction. All analyzed PHA lectins increased the level of Bax gene expression compared to controls. Regarding caspases, PHA-E was shown to be the most powerful inductor of these proteins expression, but other isolectins were able to induce

caspases expression too. The differences between tumor and non-tumor cell lines were also revealed in this case. Thus, using Western blot analysis the PHA-E was shown to be the most effective Cas8 inducer in 4BL cells, whereas in Hep-2 cell line the strongest effect has been shown in total PHA-treated cell culture. These data were supported by RT-PCR: it was shown that both PHA-L and PHA-E cause the significant enhancing of *Bax* mRNA expression. Another apoptosis-associated protein coding gene, *Bcl-2*, have been shown to significantly reduce its expression on mRNA level under the PHA-E treatment, but not in PHA-L- and total PHA-treated cells. These data are strongly consistent, because *Bcl-2* is anti-apoptotic protein.

We obtained the computational model of leukoagglutinin complexes with pro-apoptotic receptors (FasR and TNFR-1) and anti-apoptotic receptors (IGF-1 and EGFR). We revealed that leukoagglutinin is able to interact with these important receptors through protein-protein binding with high energy. Thus, for FasR receptor the Gibbs binding energy was appreciated to be -620,0 kJ/M. for TNFR-1 it was -863,8 kJ/m, for IGF-1 - -567,4 kJ/M, and for EGFR it has been valued as -609,4 kJ/M. These calculations supports our hypothesis that PHA isolectins could be the modulators of apoptosis, mainly, pro-apoptotic agents, due to their involvement in regulatory pathways and via both receptor-dependent and mitochondrial mechanism of apoptosis induction.

Keywords: *Lectins, cells culture, apoptosis, isolectins, survival, caspases, Bax, Bcl-2, docking*