

НАЦІОНАЛЬНА АКАДЕМІЯ НАУК УКРАЇНИ
ІНСТИТУТ МОЛЕКУЛЯРНОЇ БІОЛОГІЇ І ГЕНЕТИКИ
ННЦ «ІНСТИТУТ БІОЛОГІЇ ТА МЕДИЦИНИ»
КИЇВСЬКОГО НАЦІОНАЛЬНОГО УНІВЕРСИТЕТУ
ІМЕНІ ТАРАСА ШЕВЧЕНКА

КОЛОМІЄЦЬ ЛЕСЯ АНАТОЛІВНА



УДК 577.217.5

577.152.611

**СТВОРЕННЯ ТА ХАРАКТЕРИСТИКА НАНОКОМПОЗИТНОГО
КОМПЛЕКСУ ПРОТИПУХЛИННОГО ЦИТОКІНА
ЕМАР II З ДЕКСТРАНОМ 70**

03.00.20 – біотехнологія

АВТОРЕФЕРАТ

дисертації на здобуття наукового ступеня

кандидата біологічних наук

КИЇВ – 2020

Дисертація є рукописом

Роботу виконано у відділі білкової інженерії та біоінформатики Інституту молекулярної біології і генетики НАН України та на кафедрі мікробіології та імунології ННЦ «Інститут біології та медицини» Київського національного університету імені Тараса Шевченка (м. Київ)

Науковий керівник: член-кореспондент НАН України
доктор біологічних наук, професор
Корнелюк Олександр Іванович
Інститут молекулярної біології і генетики
НАН України,
завідувач відділу білкової інженерії та
біоінформатики

Офіційні опоненти: доктор біологічних наук, професор
Колибо Денис Володимирович,
Інститут біохімії імені О.В. Палладіна
НАН України,
завідувач лабораторією імунології

доктор біологічних наук, професор
Курдиш Іван Кирилович
Інститут мікробіології і вірусології
ім. Д.К. Заболотного НАН України,
завідувач відділу мікробіологічних процесів
на твердих поверхнях

Захист відбудеться «22» грудня 2020 року о 10³⁰ на засіданні спеціалізованої вченої ради Д 26.237.01 Інституту молекулярної біології і генетики НАН України за адресою: вул. Академіка Заболотного, 150, м. Київ, 03143.

З дисертацією можна ознайомитись у науковій бібліотеці Інституту молекулярної біології і генетики Національної Академії Наук України за адресою: вул. Заболотного, 150, м. Київ, 03143.

Автореферат розіслано «20» листопада 2020 року.

Вчений секретар
спеціалізованої вченої ради,
кандидат біологічних наук, с.н.с.



І.В. Крупська

ЗАГАЛЬНА ХАРАКТЕРИСТИКА РОБОТИ

Актуальність теми. Ендотеліальний та моноцитарноактивуючий поліпептид II (EMAP II) є продуктом протеолітичного розщеплення мультифункціонального білка p43, що входить до складу аміноацил-tРНК синтетазного комплексу (кодосоми) вищих еукаріотів (Quevillon et al, 1997) і є його обов'язковим компонентом (Wolfe et al, 2009). Рівень EMAP II відіграє важливу регуляторну роль в індивідуальному розвитку за допомогою модуляції ангиогенезу і, як наслідок, кровопостачання тканин і органів, а також ендотеліально-мезенхімальних взаємодій (Zhang et al, 2002). Крім того, він бере участь в ембріогенезі та деяких патологічних процесах, виконує допоміжну роль при апоптозі клітин (Murray et al, 1999). Подальші дослідження EMAP II показали, що він має антипухлинні та протизапальні активності (Schwarz et al, 2008; Kim et al, 2010). У нормі EMAP II експресується в клітинах різних тканин, але, як правило, його експресія є значно вищою в пухлинах (Murray et al, 2000). При цьому клітини різних пухлин відрізняються за рівнем його експресії. EMAP II експресується в інфільтруючих в пухлину макрофагах, служить медіатором, що залучає в пухлину макрофаги, а також є модулючим фактором експресії ендотеліального фактора судинного росту VEGF, що обумовлює адгезію молекули ICAM-1, фактора некрозу пухлин TNF (Berger et al, 2000) і ряду клітинних рецепторів. Встановлено, що EMAP II і TNF α проявляють синергізм при впливі на пухлинну тканину (Crippa et al, 2008).

Найбільш помітна роль EMAP II пов'язана з патологічними процесами, в першу чергу, з гострою імунною відповіддю і онкогенезом (Horssen et al, 2008; Zhou et al, 2020). У зв'язку з цим в ряді країн ведуться масштабні експериментальні дослідження біологічних властивостей EMAP II.

Слід зазначити, що до цього часу EMAP II ще не застосовується як протипухлинний препарат в клінічній онкології, оскільки не проведені його доклінічні та клінічні випробування. Однією з причин є відсутність налагодженої методики отримання цього цитокіна в препаративних кількостях як нового біотехнологічного продукту, а також здатність білка до агрегації.

Білкові препарати пропонують багато нових терапевтичних опцій, в основному направлених на лікування важких хронічних та онкологічних захворювань. Основною проблемою таких лікарських засобів, є нестабільність макромолекул білків (Hofman et al, 2016; Roberts et al, 2014). Для подолання цієї проблеми в фармакології використовують додаткові хімічні речовини (Ratanji et al, 2014), одними з яких є декстрини та циклодекстрини, які в якості допоміжних агентів здатні знизити рівень агрегації білкової компоненти, підвищити стійкість до протеолітичних ферментів крові та шлунково-кишкового тракту та збільшити розчинність (Abeylath et al, 2011). Відомо застосування декстрану для захисту та стабілізації структури білків альбуміну, стрептокінази, аспарагіну, інсуліну, гемоглобіну (Pasut 2014; Yuan et al, 2009). Фармацевтичні речовини

напроксен, даунорубіцин, мітоміцин (Hashida et al, 1980) і цисплатин (Melisi et al, 2011) були функціоналізовані декстраном як ефективні препарати. Зважаючи на це, актуальною є біотехнологічна розробка стабільного комплексу протипухлинного цитокіна ЕМАР II з декстраном 70.

Зв'язок роботи з науковими програмами, планами, темами, грантами. Дисертаційна робота відповідає основному плану науково-дослідних робіт відділу білкової інженерії та біоінформатики Інституту молекулярної біології і генетики НАН України і виконувалась у рамках тем наукових досліджень 2.2.4.28: «Дослідження нанокмпозитних комплексів білків апарату трансляції вищих еукаріотів тирозил-тРНК синтетази, ЕМАР II та АІМР/p43: фундаментальні та прикладні аспекти» (2018-2022), номер державної реєстрації 0117U002878; «Фундаментальні основи технології отримання нових антипухлинних цитокінів ЕМАР II та АІМР1/p43 та їх нанокмпозитних комплексів» (2015-2019), номер державної реєстрації 0111U000518. Викладені у дисертації положення є складовою частиною комплексних досліджень кафедри мікробіології та імунології ННЦ «Інституту біології та медицини» Київського національного університету імені Тараса Шевченка в рамках бюджетної теми «Механізми реалізації адаптаційно-компенсаторних реакцій організму за умов розвитку різних патологій» (2011-2015), номер державної реєстрації 11БФ036-01.

Мета та завдання дослідження. Метою дисертаційної роботи було проведення оптимізації бактеріальної експресії протипухлинного цитокіна ЕМАР II, отримання гомогенного препарату рекомбінантного білка ЕМАР II високого ступеня чистоти в препаративних кількостях, біотехнологічна розробка нанокмпозитного комплексу ЕМАР II з декстраном 70 для стабілізації білка та дослідження його характеристик.

Відповідно до мети роботи було поставлено наступні завдання:

1. Провести підбір оптимальних умов бактеріальної експресії ЕМАР II з метою оптимізації процесу отримання цього білка; провести очистку та отримати в препаративній кількості рекомбінантний цитокін ЕМАР II.
2. Дослідити вплив температури на стабільність білка ЕМАР II у складі нанокмпозитного комплексу з декстраном 70.
3. Вивчити агрегаційні властивості поліпептиду ЕМАР II у вільному стані та у складі нанокмпозитного комплексу з декстраном 70.
4. Провести біомедичні дослідження нанокмпозитного комплексу, визначити вміст ендотоксинів в нанокмпозитному комплексі ЕМАР II.
5. Дослідити вплив комплексу ЕМАР II з декстраном 70 на чутливість клітин до фактору некрозу пухлин α .
6. Визначити ступінь токсичності створеного комплексу ЕМАР II з декстраном 70 на мишах лінії Balb/c.
7. Дослідити вплив комплексу ЕМАР II з декстраном 70 на ксенотрансплантанти аденокарциноми простати людини у мишей лінії СВА.

Об'єкт дослідження: ендотеліальний моноцит активуючий поліпептид II.

Предмет дослідження: нанокмпозитний комплекс ЕМАР ІІ з декстраном 70 та його біологічна активність.

Методи дослідження: бактеріальна експресія рекомбінантних білків, трансформація бактеріальних клітин, афінна хроматографія на Ni-NTA агарозі, електрофоретичні дослідження, спектрофотометрія, флуоресцентна спектроскопія, робота з культурами клітин, лазерна кореляційна спектрометрія, робота з тваринами, визначення ендотоксинів методом гел-тромб тесту (LAL-тест), отримання ксенографтів пухлин, методи комп'ютерного моделювання, докінгу та молекулярної динаміки, статистичний аналіз та ін.

Наукова новизна одержаних результатів. У ході роботи вперше створено нанокмпозитний комплекс ендотеліального моноцитакивуючого поліпептида ІІ (ЕМАР ІІ) з декстраном 70. Визначено оптимальні умови експресії рекомбінантного білка ЕМАР ІІ в бактеріальній системі експресії. Показано стабілізацію білка ЕМАР ІІ у комплексі з декстраном 70 шляхом взаємодії амінокислотних залишків ЕМАР ІІ: Arg12, Gly36, Glu37, Ile38, Arg41, Lys68, Lys71, Met72, Arg73, Leu76, Lys116, Asn119, Lys121, Lys123, Trp125, Lys166 з декстраном 70. Запропонований можливий механізм агрегації цитокіна ЕМАР ІІ та механізм її запобігання. Проведено низку експериментів щодо встановлення біологічних властивостей нанокмпозитного комплексу ЕМАР ІІ з декстраном 70.

Практичне значення одержаних результатів. Запропоновано та створено термостабільний комплекс ЕМАР ІІ з декстраном 70, що дозволить в майбутньому проводити доклінічні дослідження його як потенційного протипухлинного комплексу. Оптимізовано бактеріальну експресію цитокіну ЕМАР ІІ та отримання білка високого ступеня чистоти в препаративних кількостях.

Особистий внесок здобувача. Всі дослідження виконувались за безпосередньої участі здобувача. Автор самостійно підібрав та провів аналіз наукової літератури за темою дисертації. Здобувач особисто підготував та оформив описи патентів на корисні моделі. Більшість представлених експериментів, а також обробку і аналіз отриманих результатів виконано особисто здобувачем. Отримані результати обговорено та опубліковано в спільних публікаціях. Комп'ютерне моделювання та докінг проводили спільно з м.н.с. Д. М. Ложко, дослідження агрегаційних властивостей проводили на базі Інституту біохімії ім. О.В. Палладіна, вплив комплексу ЕМАР ІІ з декстраном 70 на продукцію TNF досліджували спільно з к.б.н., н.с. О.С. Богорад-Кобельською, вплив ЕМАР ІІ на проліферацію культур клітин досліджували спільно з к.б.н. К.В.Коцаренко, вплив комплексу ЕМАР ІІ з декстраном 70 на апоптоз культур клітин досліджували спільно з к.б.н. Т.О. Голобородько, протипухлинну активність ЕМАР ІІ та його комплексу на тваринах досліджували спільно з к.б.н. Л.І. Поляковою. Здобувачем самостійно запропоновано та створено комплекс ЕМАР ІІ з декстраном 70, досліджена його активність, проведена оптимізація експресії рекомбінантного

цитокіна ЕМАР II та показана стабілізація білка ЕМАР II шляхом утворення комплексу з декстраном 70. Автор висловлює подяку д.б.н., проф., член-кор. НАН України Корнелюку О.І. за керівництво, допомогу в плануванні експериментів та обговоренні отриманих результатів. Автор щиро вдячний співробітникам відділу білкової інженерії та біоінформатики Інституту молекулярної біології і генетики НАН України за корисні поради під час планування досліджень та обговорення результатів.

Апробація матеріалів дисертації. Основні положення дисертації були апробовані на засіданнях відділу білкової інженерії та біоінформатики Інституту молекулярної біології і генетики НАН України. Результати досліджень було також представлено та обговорено на 13-ти конференціях: X Український біохімічний з'їзд (13-17 вересня 2010р, Одеса, Україна), FEBS Special Meetings Jak Stat Signaling: From Basics to Disease (10-13 February 2010, Vienna, Austria), VI Міжнародна наукова конференція студентів і аспірантів «Молодь і поступ біології» (21-24 вересня 2010, Львів, Україна), Міжнародна наукова конференція студентів та молодих вчених «Актуальні питання сучасної медицини» (24-26 березня 2011, Харків, Україна), 15 Международная Пуцинская школа-конференция молодых ученых "Биология наука XXI века"(Пушино 2011г., Россия), 36 th FEBS Congress "Biochemistry for tomorrow's medicine" (25 - 30 June 2011, Torino (Turin), Italy), П'ята Конференція молодих вчених інституту молекулярної біології і генетики НАН України, присвячена 130-річчю від дня народження О.О. Богомольця, (24-25 травня, 2011, Київ, Україна), The 4th International IMBG Conference for Young Scientists "Molecular Biology Advances and Perspectives", (14-17 September, 2011, Ukraine); X Міжнародна конференція молодих науковців «Біологія: від молекули до біосфери» (2-4 грудня 2015, Харків, Україна), XI міжнародна конференція молодих учених «Біологія: від молекули до біосфери» (Харків, 2016, Україна); XII Український біохімічний конгрес (30 вересня-4 жовтня 2019, Тернопіль, Україна).

Публікації. За матеріалами дисертаційної роботи опубліковано 23 наукові праці, з них 8 статей у фахових журналах, 2 патенти на корисні моделі та 13 тез доповідей у збірках матеріалів вітчизняних та міжнародних наукових конференцій та з'їздів.

Структура та обсяг дисертації. Дисертація складається зі вступу, огляду літератури, матеріалів та методів досліджень, результатів експериментальних досліджень, аналізу та узагальнення отриманих результатів, висновків, списку використаних джерел, який охоплює 213 найменувань. Дисертацію викладено на 153 сторінках стандартного машинопису, вона містить 22 рисунки, 5 таблиць та 2 додатки. Результати дисертації та допоміжні матеріали проілюстровано на рисунках та представлено в таблицях.

ОСНОВНИЙ ЗМІСТ РОБОТИ

Матеріали та методи досліджень

Експресія рекомбінантного білка ЕМАР ІІ. Для експресії рекомбінантного білка у бактеріальній системі використовували плазмідний вектор рЕТ30а (Novagen), присутність відповідної вставки ДНК підтверджена секвенуванням нуклеотидної послідовності. Рекомбінантний білок ЕМАР ІІ експресували у клітинах *E. coli* (штам *BL21(DE3)pLysE*) та очищували за допомогою Ni+NTA агарози (Qiagen, Німеччина) згідно з рекомендаціями виробника. Концентрацію білка визначали методом Бредфорд (Bradford, 1976) та спектрофотометрично. Чистоту білка визначали за допомогою ПААГ в денатуруючих умовах. Відщеплення His-мітки від рекомбінантного ЕМАР ІІ проводили в реакції з ентерокиназою (BioLabs, Англія) згідно рекомендацій виробника.

Оптимізація процесу біосинтезу рекомбінантних білків. Оптимізацію бактеріальної експресії рекомбінантного білка ЕМАР ІІ проводили аналогічно схемі експресії рекомбінантних білків, маніпулюючи такими параметрами, як час культивування бактеріальної культури до та після індукції синтезу цільових білків, кількість індуктора та склад поживного середовища. Для індукції синтезу рекомбінантного білка в культуральне середовище додавали ізопропіл- β -тіогалактопіранозид (IPTG, Fermentas, Литва) до кінцевих концентрацій 0,5, 0,75, 1, 1,25, 1,5 мМ. Час культивування культур до індукції та після індукції експресії варіювали від 1 до 3 год та від 1 до 5 год відповідно. Найбільш ефективної експресії білка ЕМАР ІІ досягали шляхом підбору оптимального середовища культивування бактеріальної культури. Для цього культури вирощували на середовищі LB, м'ясо-пептонному бульйоні та на мінімальному середовищі А.

Дослідження взаємодії рекомбінантного білка ЕМАР ІІ з декстраном 70 методом флуоресцентної спектроскопії. Для дослідження взаємодії рекомбінантного білка ЕМАР ІІ з декстраном 70 проводили титрування білка декстраном 70 (Biotika, Словаччина), який розчиняли у аліквоті білка (буфер: 50 мМ Na-фосфат, рН=7,5, 150 мМ NaCl) та протягом 30 хв перемішували при кімнатній температурі. Спектри флуоресценції реєстрували на спектрофлуориметрі Hitachi M850 (Японія), який обладнаний термостатованим кюветотримачем. Вимірювання проводили у кварцевій кюветі з довжиною оптичного шляху 1см. Спектральна ширина щілин монохроматора при збудженні флуоресценції та її реєстрації становила 5–10 нм. Збудження флуоресценції проводили при 280 нм, реєстрацію флуоресценції - в діапазоні 300–400 нм під кутом 90⁰ до напрямку пучка збуджуючого світла при температурах від 23 до 65 °С. Реєстрацію впливу температури на стабільність комплексу рекомбінантного білка проводили за допомогою спектрофлуориметра JASCO (Японія), обладнаного

термостатованим кюветотримачем. Для зниження впливу випадкових факторів спектри флуоресценції білків визначали не менше трьох разів.

Біотехнологічна розробка нанокмпозитного комплексу ЕМАР II.

Попередньо методами спектрофотометричного, флуориметричного та біоінформатичного аналізу нами було встановлено, що комплекс ЕМАР II з декстраном 70 утворюється при молярному співвідношенні 1:1. Очищений препарат ЕМАР II стерилізували методом холодної фільтрації через мембрани «Roth» з розміром пор 0,22 мкм. Для створення нанокмпозитного комплексу до розчину рекомбінантного білка ЕМАР II з концентрацією 100 мкг/мл додали 700 мкг декстрану 70, порошок (субстанція) у подвійних поліетиленових мішках для виробництва стерильних лікарських форм. Суміш інтенсивно струшували впродовж 30 хв. при 25 °С для утворення комплексу. По 1 мл. розчину комплексу ЕМАР II з декстраном 70 стерильно розливали в ампули. Ампули з комплексом ЕМАР II заморожували в декілька циклів при -80°С протягом 96 год. та ліофілізували.

Динамічне розсіювання світла. Вимірювання проводили на лазерному кореляційному спектрометрі “ZetaSizer-3” (Malvern Instrument, Британія). Реєстрацію та статистичну обробку лазерного випромінювання, розсіяного в розчинах ЕМАР II та його комплексу з декстраном 70, проводили 5-разово протягом 60 с в діапазоні температур від +20°С до +55°С під кутом розсіювання 90°. Отримані результати вимірювань обробляли за допомогою сервісної комп’ютерної програми PCS-Size mode v1.61. Для дослідження нанокмпозитного комплексу ЕМАР II з декстраном 70 методом фотонної кореляційної спектроскопії на лазерному кореляційному спектрометрі використовували наступні концентрації складових: ЕМАР II з концентрацією 0,6 мг/мл (6,87 мкМ) та декстран 70 з концентрацією 50 мг/мл (7,1 мМ).

Біоінформатичний аналіз. Моделювання комплексу ЕМАР II з декстраном 70 здійснювали за допомогою програми AutoDock Vina. Для проведення докінгу використано просторову структуру ЕМАР II, визначену методом рентгеноструктурного аналізу (PDB ID: 1EUI). Візуалізацію та аналіз отриманих комплексів проводили з використанням програмного забезпечення UCSF Chimera та MGLTools. Молекулярну структуру декстрану представлено у вигляді невеликого фрагменту полісахариду, побудованого із залишків α -D-глюкопіранози. Моделювання взаємодії між просторовими структурами ЕМАР II проводили за допомогою веб-серверів для макромолекулярного докінга Cluspro 2.0 та SymmDock. Візуалізацію, аналіз просторової структури та розрахунок радіусу гірації здійснювали у програмному забезпеченні UCSF Chimera.

Визначення вмісту ендотоксинів у нанокмпозитному комплексі ЕМАР II з декстраном 70 методом гель-тромб тесту (LAL-тест). Для проведення LAL-тесту змішували рівні кількості LAL-реактиву та досліджуваного зразка. Проводили тест згідно рекомендацій виробника (Endosafe®, США). Реакційні суміші інкубували протягом 1 години при 37°С. Розрахунок гранично допустимої дози ендотоксину для фармацевтичних препаратів:

(К/М)*активність препарату, згідно Державної фармакопеї України. Використовували наступні розведення нанокмпозитного комплексу: без розведення (чутливість лізату 0,03МОЕ), розведення 1:160 (відповідає 5 МОЕ/кг) та 1:1600 (відповідає 0,5 МОЕ/кг).

Вивчення здатності комплексу ЕМАР II з декстраном 70 впливати на чутливість до фактору некрозу пухлин проводили на модельних культурах клітин лінії L929 (фібробласти зі сполучної тканини миші С3Н/An, сублінія "а"), отриманих з клітинного банку Інституту експериментальної патології, онкології та радіобіології ім. Р. Є. Кавецького НАН України, та культурі клітин PST(тестикули поросяти), отримані з колекції Інституту ветеринарної медицини УААН, що знаходились у логарифмічній фазі росту з часом генерації 24 години. Для індукції інтерферону (ІФН) клітини L929 та PST культивували у присутності 0,188, 0,375, 0,75, 1,5, 3, 6, 12,5 та 25 мкг/мл препарату ЕМАР II та відповідних концентрацій декстрана 70 (від 354 до 2,77 мкг/мл з послідовним дворазовим розведенням) впродовж 24 годин. Визначення рівня індукованого ІФН у зразках середовища культивування проводили за допомогою методу мікротитрування на культурі клітин L929 проти тест-вірусу – вірусу везикулярного стоматиту (ВВС, штам Індіана, Депозитарій Інституту мікробіології та вірусології ім. Д.К. Заболотного НАН України). Для індукції TNF α використовували клітини PST. Активність TNF α у середовищі культивування клітин визначали за цитотоксичною дією на культуру перевивних мишачих фібробластів L929. Результат враховували за допомогою вертикального планшетного спектрофотометра Multiscan Ascent ("Thermo Labsystems", Фінляндія) при довжині хвилі 540 нм. Індекс цитотоксичності вираховували як $ЦІ = (a-b)/a * 100\%$, де а та b – показники оптичної густини контрольних клітин та клітин, оброблених зразками середовища культивування, відповідно. Перерахунок у нг/мл здійснювали використовуючи апроксимаційну формулу $Y=3,985\ln(X)+75,341$. Звідси, $X=\exp((Y-75,341)/3,985)$. Досліди проводили у 3 повторях.

Визначення токсичності створеного комплексу ЕМАР II з декстраном 70 на мишах лінії Balb/c. Для встановлення гострої токсичності - ЛД 50 нанокмпозитного комплексу ЕМАР II з декстраном 70 використовували 30 самців-мишей лінії Balb/c, віком 2-3 місяці, розведених у віварії Інституту молекулярної біології і генетики НАН України. Нанокмпозитний препарат ЕМАР II одноразово підшкірно вводили мишам в дозах 300, 1000 та 10 000 мкг/кг маси тіла, що перевищує запропоновану нами терапевтичну дозу в 30, 100 та 1000 разів відповідно. Оцінювали наступні показники загальної дії та токсичності: 14-добова летальність (реєструвалась щоденно); клінічна картина: загальний стан тварин, поведінка, збудливість та спонтанна рухова активність тварин; динаміка маси тіла (реєструвалась щоденно); загальний неврологічний статус: порушення пози тіла та координації рухів; стан вегетативних функцій: порушення дефекації та діуреза; макроскопічне дослідження внутрішніх органів при розтині етаназованих тварин. Неперервне спостереження за тваринами проводили протягом перших 8

годин після введення препарату. В подальший період їх стан відмічали двічі на день протягом 14 днів. Патоморфологічні прояви токсичності визначали при автопсії в кінці експерименту при макроскопічному дослідженні внутрішніх органів тварин.

Для дослідження хронічної токсичності нанокмпозитний препарат ЕМАР ІІ з декстраном 70 підшкірно вводили мишам в дозах 300 та 1000 мкг/кг маси тіла, що перевищує терапевтичну дозу в 30 та 100 разів відповідно. Загальну дію нанокмпозитного комплексу ЕМАР ІІ з декстраном 70 оцінювали по динаміці маси тіла тварин при зважуванні 2 рази на тиждень. Вегетативний статус оцінювали по стану слизових, шерстяного покриву, наявності саливації, діареї, охайності тварин. В кінці експерименту проводили патоморфологічне дослідження внутрішніх органів після аутопсії. Внутрішні органи (серце, печінка, легені, нирки) виділяли та зважували.

Дослідження впливу комплексу ЕМАР ІІ з декстраном 70 на ксенотрансплантанти аденокарциноми простати людини у мишей лінії СВА проводили на 27 мишах лінії СВА (маса тіла 18-22г) розведених у віварії Інституту ендокринології та обміну речовин ім. В.П. Комісаренка НАМН України при дотриманні біоетичних вимог гуманного ставлення до тварин нефро-субкапсулярним методом (підкапсулярний тест Богдена). Видалену під час простатектомії пухлинну тканину доставляли в лабораторію в охолоджену середовищі MEM (Serva), що містить сольову суміш Хенкса і буфер НЕРЕС. Зразки тканин, патогістологічно верифіковані як аденокарцинома передміхурової залози, взяті для експериментальних досліджень у трьох хворих згідно отриманої інформованої письмової згоди під час планової радикальної простатектомії (операції виконані у Київському міському клінічному онкологічному центрі). Пухлину нарізали на шматочки масою 1 мг± 0,02 і трансплантували під капсулу однієї з нирок мишей (по 2 ксенографти). Мишей внутрішньочеревинно наркотизували хлоралгідратом у розрахунку 400 мг/кг та вводили під капсулу нирки шматочки пухлини. Після триденного періоду вільного росту пухлини мишам вводили розчин білка ЕМАР ІІ та окремо комплексу ЕМАР ІІ з декстраном 70 в дозах 5, 10, 100 мкг/кг маси тіла, а контрольним тваринам – фізіологічний розчин. Через 24 години після останньої ін'єкції мишей знеживлювали диетиловим ефіром, проводили розтин та вилучали ксенографти. Вилучені трансплантати зважували та вираховували середній приріст маси ксенографтів. Трансплантати фіксували в 4 % параформальдегіді, заливали в парафінові блоки та готували серійні зрізи, які фарбували гематоксиліном та еозином. Протипухлинний ефект оцінювали за ступенем гальмування росту ксенографтів порівняно з контрольною групою.

Вплив комплексу ЕМАР ІІ з декстраном 70 на проліферацію та апоптоз культур клітин. Для дослідження здатності комплексу ЕМАР ІІ з декстраном 70 впливати на проліферацію та виживаність клітин використовували культури клітин Нер-2 –лінії клітин раку гортані та 4BL6 – іморталізована клітинна лінія з периферичних клітин крові людини.

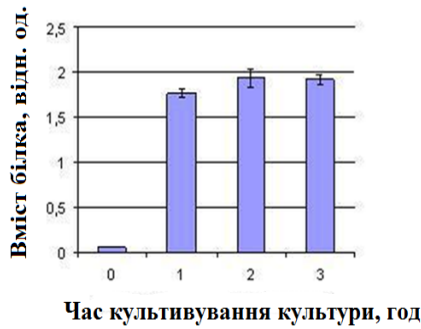
Клітини культивували в стандартному ростовому середовищі DMEM з додаванням 10% ембріональної сыворотки великої рогатої худоби та антибіотиків (пеніциліна та стрептоміцина) в термостаті з постійним рівнем CO₂ (5%) при 37°C до утворення повного моношару клітин. В дослідному варіанті клітини інкубували протягом 24 годин в середовищі DMEM без сыворотки з додаванням комплексу ЕМАР II з декстраном 70. Середовище DMEM після обробки видаляли та заміняли ростовим середовищем. До та після обробки культур клітин цитокином ЕМАР II та його комплексу з декстраном 70 моношар клітин відмивали розчином PBS або середовищем DMEM. В контролі клітини знаходились в середовищі без сыворотки. Цитокин ЕМАР II використовували в діапазоні концентрацій 0,2-20 мкг/мл.

Візуалізацію рівня виживаності культури проводили з використанням реакції трансформації живими клітинами (3-(4,5-диметилтіазол-2-іл)-2,5-дифенілтетразолою броміда (МТТ) у формазан за допомогою вертикального планшетного спектрофотометру Titertek“Multiscan” при довжині хвилі 540 нм.

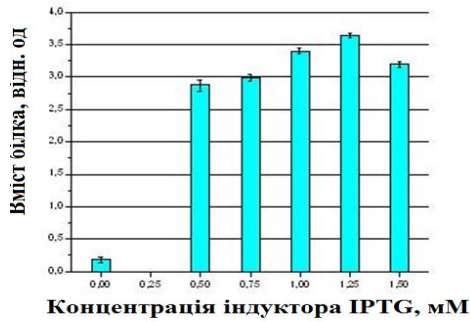
Статистична обробка результатів. Для статистичного аналізу експериментальних даних використовували програми OriginPro 8 («StatSoft Inc», США) та Excel (MS Office 2010) («Microsoft Corporation», США). Результати експериментів були представлені у вигляді середнього арифметичного \pm стандартне відхилення. Різницю між незалежними вибірками оцінювали за допомогою *t*-критерію Стьюдента і вважали статистично значущою при $p < 0,05$. При обрахунку здатності нанокмозитного комплексу впливати на продукцію фактора некрозу пухлин та інтерферон у культурі клітин нульову гіпотезу для контрольної та дослідних груп порівняння перевіряли за допомогою непараметричного критерію Манна-Уїтні. Відмінності між групами вважали статистично значимими при $p < 0,05$. Усі дані, які підлягали статистичному аналізу, були отримані в результаті щонайменше трьох незалежних експериментів.

Результати досліджень та їх обговорення

Оптимізація бактеріальної експресії та очистка білка ЕМАР II. Для вирішення поставлених задач необхідно отримати білок у препаративних кількостях з високим ступенем чистоти. Для цього ми провели експресію білка в бактеріальній культурі *E. coli* (штам *BL21(DE3)pLysE*). При проведенні оптимізації умов культивування штаму-продуценту цитокина ЕМАР II встановлено, що максимальна кількість білка спостерігається за умови додавання в середовище культивування індуктора на другу годину росту культури ($OD_{600} = 0,7-0,9$), що пояснюється ймовірним досягненням культурою найбільш сприятливої фази – логарифмічної фази росту (рис. 1а).



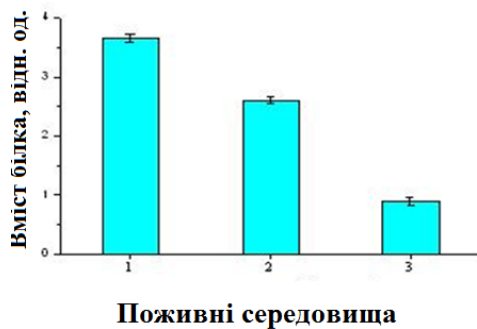
а) Рівень експресії білка ЕМАР II залежно від часу культивування бактеріальної культури до індукції.



б) Рівень експресії білка ЕМАР II залежно від кількості індуктора IPTG.



в) Рівень експресії білка ЕМАР II залежно від часу культивування культури після індукції



г) Рівень експресії білка ЕМАР II залежно від середовища культивування бактеріальної культури. 1 - мінімальне середовище А; 2 - середовище LB; 3 – м'ясо-пептонний бульйон;

Рис.1. Оптимізація експресії рекомбінантного білка ЕМАР II в клітинах *E. coli* штам *BL21(DE3)pLysE*

Встановлено найбільший вихід рекомбінантного білка ЕМАР II за наступних умов: культивування культури до індукції 2 год. (рис 1. а), концентрація індуктора 1,25 мМ (рис 1. б), час культивування культури після індукції 4,5 год. (рис. 1.в), на мінімальному поживному середовищі А (рис.1.г). Отримано згідно електрофоретичних та спектрофотометричних даних рекомбінантний цитокін ЕМАР II із чистотою близько 95% (рис.2).

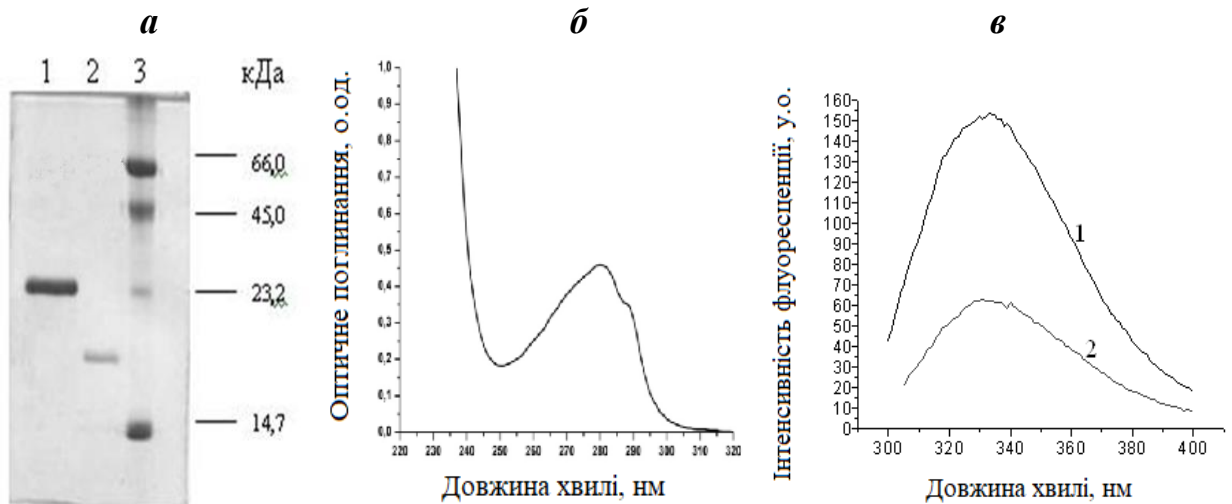


Рис. 2. Електрофоретичний (а), спектрофотометричний (б) та флуоресцентний (в) (1- $\lambda_{\text{ex}}=280$ нм, 2- $\lambda_{\text{ex}}=296$ нм) аналіз отриманого білка ЕМАР ІІ

Варто зазначити, що вихід з 1 л культуральної рідини складає близько 70 мг ЕМАР ІІ. В подальших дослідженнях використовували розщеплений ентерокиназою поліпептид ЕМАР ІІ.

Дослідження впливу температури на стабільність комплексу ЕМАР ІІ з декстраном 70 та дослідження його агрегаційних властивостей. При титруванні розчину білка ЕМАР ІІ декстраном 70 (рис. 3) спостерігається падіння інтенсивності власної флуоресценції білка при підвищенні концентрації ліганда, що може свідчити про міцне зв'язування ліганда з білком і утворення комплексу.

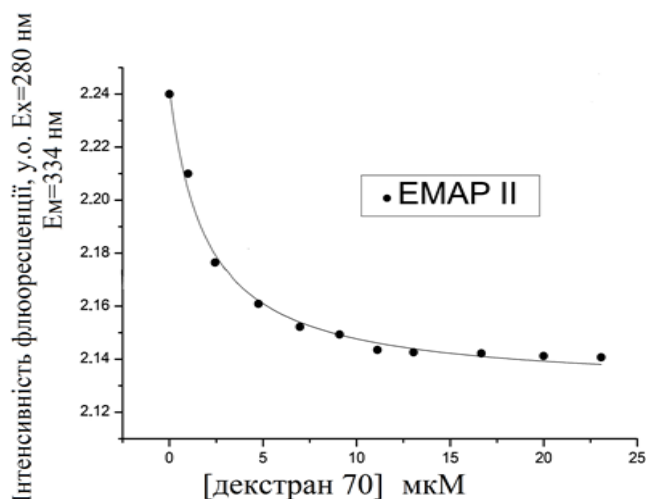


Рис 3. Залежність інтенсивності флуоресценції білка ЕМАР ІІ від концентрації декстрану 70 у розчині, $\lambda_{\text{EX}} 280$ нм, $\lambda_{\text{EM}} 334$ нм. Буфер 50 мМ Na-фосфат, 150 мМ NaCl, рН 7,5, температура 25 °С. Початкова концентрація ЕМАР ІІ 10 μM , декстрана 70 – 100 μM

За отриманими залежностями розрахована константа дисоціації (K_d) для ЕМАР ІІ із декстраном 70, яка складає $1,97 \pm 0,17 \mu\text{M}$. Стехіометрія зв'язування декстрану 70 з білком становить близько 1:1, що підтверджує формування специфічного комплексу.

При дослідженні впливу декстрану 70 на стабільність білкової глобули ЕМАР II ми вивчали наявність локального конформаційного переходу у поліпептида ЕМАР II за температур 22 – 65 °С. Це обумовлено тим, що при підвищенні температури в молекулі ЕМАР II спостерігається локальний конформаційний перехід, пов'язаний з експонуванням залишку Trp на поверхні білка. Виявлено зсув максимуму флуоресценції вільного білка ЕМАР II від 334 до 345 нм. Температура локального конформаційного переходу вільного ЕМАР II становить $43 \pm 1^\circ\text{C}$. При утворенні комплексу з декстраном 70 локальний конформаційний перехід в оточенні Trp125 спостерігається при $49 \pm 1^\circ\text{C}$, що свідчить про термостабілізацію структури ЕМАР II у комплексі. Отриманий комплекс є більш стабільним до дії високих температур порівняно з вільним білком ЕМАР II (рис. 4).

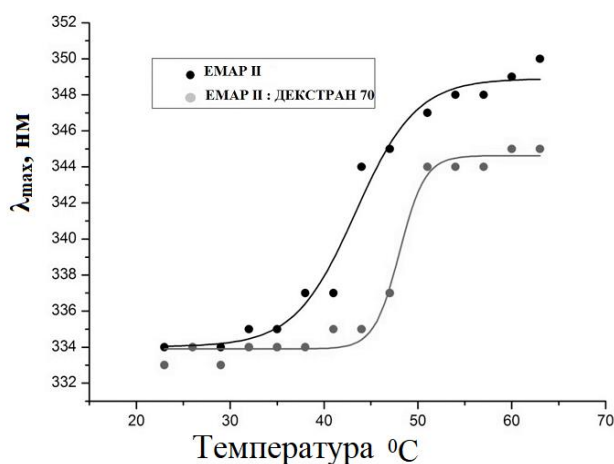


Рис. 4. Температурна залежність значення довжини хвилі в максимумі емісії для вільного ЕМАР II та ЕМАР II у комплексі з декстраном 70.

Буфер: 50 мМ Na-фосфат, рН 7.5, 150 мМ NaCl. λ_{EX} 280 нм

При дослідженні впливу температури на агрегаційні властивості ЕМАР II методом динамічного світорозсіювання встановлено, що при підвищенні температури відбувається значне зростання гідродинамічного діаметру молекул вільного білка у розчині (рис.5). Цей ефект обумовлений агрегацією білка. В той же час з підвищенням температури розмір частинок ЕМАР II у комплексі з декстраном 70 не змінюються і така тенденція зберігається до температури 55 °С. Ці дані свідчать, що комплекс ЕМАР II з декстраном 70 є досить стабільним при високих температурах і що полісахарид декстран 70 стабілізує білкову глобулу ЕМАР II та перешкоджає процесу агрегації.

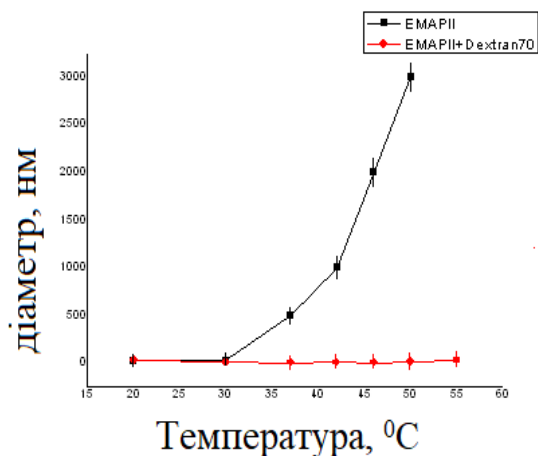


Рис. 5. Розподіл розмірів білка ЕМАР II та комплексу ЕМАР II з декстраном 70 у розчині за різних температур

Отже, в результаті проведених досліджень показано температурну стабілізацію білка ЕМАР ІІ при утворенні комплексу з декстраном 70 та суттєве зниження агрегації білка ЕМАР ІІ при підвищенні температури до 55⁰С.

Біоінформатичний аналіз. Для з'ясування природи формування агрегатів білка ЕМАР ІІ проводили комп'ютерне моделювання взаємодії між окремими мономерами білка (рис. 6) за допомогою веб-серверів для макромолекулярного докінга Cluspro 2.0 та SymmDock. Для комп'ютерного моделювання було використано просторову структуру ЕМАР ІІ, визначену методом рентгеноструктурного аналізу (Protein Data Bank код 1EUI). Аналіз просторових структур білка виявив, що одну з ключових ролей у формуванні контакту між різними молекулами ЕМАР ІІ відіграє неструктурована петля ³⁴DVGEIAPR⁴¹ молекули білка, яка при взаємодії з іншою молекулою білка блокує гідрофобну триптофанову “кишеню” на його поверхні. Взаємодія між неструктурованою петлею і амінокислотним оточенням триптофанового залишка має гідрофобний характер, що може забезпечувати достатній рівень енергії зв'язування між ними, а просторова структура петлі ³⁴DVGEIAPR⁴¹ відповідає формі триптофанової “кишені”.

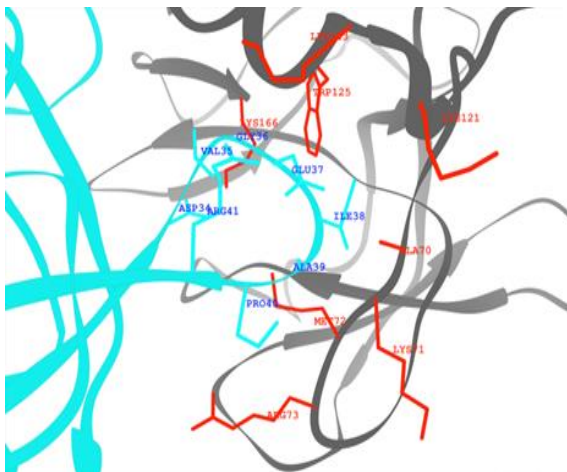


Рис. 6. Формування молекулярних контактів між молекулами ЕМАР ІІ в процесі утворення агрегатів білка. На одній молекулі ЕМАР ІІ зображена неструктурована петля ³⁴DVGEIAPR⁴¹ (виділена синім кольором), а на іншій молекулі ЕМАР ІІ зображені амінокислотні залишки (виділені червоним кольором), що входять до триптофанової “кишені”

В результаті комп'ютерного моделювання докінгу встановлено, що зв'язування декстрана з ЕМАР ІІ відбувається в “кишені” на поверхні білка, де локалізований Trp125 (рис. 7). Згідно моделі у зв'язуванні декстрана 70 з ЕМАР ІІ залучені такі залишки, як Arg12, Gly36, Glu37, Ile38, Arg41, Lys68, Lys71, Met72, Arg73, Leu76, Lys116, Asn119, Lys121, Lys123, Trp125, Lys166.

Зв'язування декстрана з ЕМАР ІІ призводить до зміщення локального конформаційного переходу в оточенні Trp125, внаслідок чого відбувається стабілізація білка у розчині. Аналіз структури комплексів декстрана з білком показав, що афінність зв'язування декстрана (ΔG) з ЕМАР ІІ складає -6.4 ккал/моль. В результаті проведених розрахунків молекулярного докінгу отримано модель просторової структури комплексу ЕМАР ІІ з декстраном

70, яка пояснює механізм стабілізації білкової глобули у розчині молекулами полісахариду.

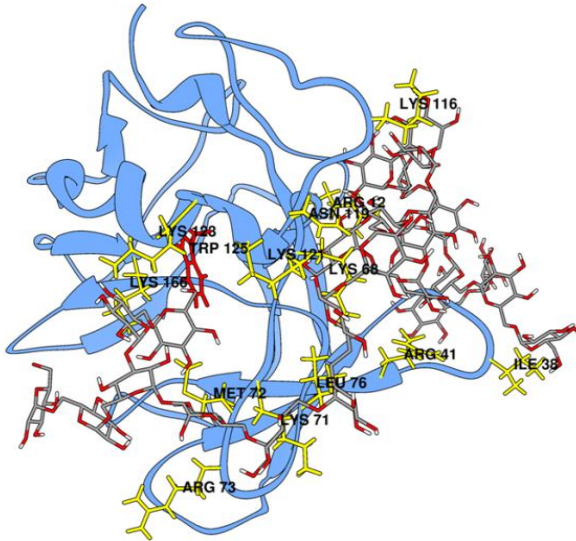


Рис. 7. Модель просторової структури комплексу ЕМАР ІІ (блакитний) з декстраном 70 (сірий), отриманої в результаті макромолекулярного докінгу за допомогою AutoDock Vina. (Залишки білка, які зв'язуються з полісахаридом виділені жовтим кольором, а декстран 70 – сірим)

Отже, згідно даних комп'ютерного моделювання структури комплексу ЕМАР ІІ з полісахаридом окремі молекули декстрана 70 блокують потенційні сайти на поверхні білка, відповідальні за утворення агрегатів ЕМАР ІІ.

Результати по моделюванню узгоджуються з експериментальними даними по термостабілізації комплексу, отриманими методом динамічного світлорозсіювання, які показано на рис. 5.

Отримані дані відносно того, що полісахарид декстран 70 стабілізує білкову глобулу ЕМАР ІІ та перешкоджає процесам агрегації, є важливим в перспективі для використання в фармацевтичній промисловості при створенні стабільних терапевтичних білків.

Визначення вмісту ендотоксинів в комплексі ЕМАР ІІ з декстраном 70. Згідно Державної фармакопеї України, проведено визначення кількості ендотоксинів в комплексі ЕМАР ІІ з декстраном 70 методом гель-тромб тесту. Гранично допустима доза ендотоксину для даного комплексу становить 5 МОЕ/кг. Чутливість LAL-реактиву 0,03 МОЕ.

При перевірці комплексу ЕМАР ІІ з декстраном 70 на наявність ліпополісахаридів встановлено, що в комплексі міститься менше, ніж 0,5 МОЕ/кг, але більше, ніж 0,03 МОЕ/кг.

Вивчення впливу комплексу ЕМАР ІІ з декстраном 70 на чутливість до фактору некрозу пухлин α .

Біологічну активність фактору некрозу пухлин у середовищі культивування клітин визначали за цитотоксичною дією на культуру перевивних мишачих фібробластів L929 (табл.1).

В результаті проведених досліджень на культурах клітин ліній L929 та PST показано, що комплекс ЕМАР ІІ з декстраном 70 здатен викликати індукцію TNF- α в культурах клітин PST при досить низьких концентраціях (1,6 – 25,0 $\mu\text{g}/\text{ml}$). Продукції інтерферону комплекс ЕМАР ІІ з декстраном 70 не викликає.

Продукція TNF- α клітинами PST під дією нанокompatитного комплексу ЕМАР II з декстраном 70

Концентрація комплексу ЕМАР II, $\mu\text{г/мл}$	Індекс цитотоксичності, %	Вміст TNF- α , нг/мл
0,2	2,83	$1,25 \times 10^{-8}$
0,4	12,61	$1,46 \times 10^{-7}$
0,8	13,72	$1,92 \times 10^{-7}$
1,6	32,00	$1,89 \times 10^{-5}$
3,1	76,46	1,32
6,3	76,16	1,23
12,5	69,55	0,23
25,0	46,71	$0,76 \times 10^{-3}$
50,0	5,22	$2,28 \times 10^{-8}$

Дослідження з декстраном 70 показали, що полімер служить лише покриттям для комплексу і не впливає на продукцію TNF- α .

Визначення ступеню токсичності створеного комплексу ЕМАР II з декстраном 70 на мишах лінії Balb/c. Для вивчення токсичної дії нанокompatитного комплексу на організм мишей ми виходили з активно діючої на пухлинні клітини згідно з попередніми дослідженнями дози 10 мкг/кг , яку перевищували у разових дозах до 1000 разів. Експериментальні дослідження токсичного впливу нанокompatитного комплексу ЕМАР II з декстраном 70 на мишах показали, що в разі введення препарату в разових дозах 300–10 000 мкг/кг не спостерігається загальнотоксичної дії препарату, і він не спричинює загибель тварин. Одразу після введення препарату спостерігалася спонтанна рухлива збудливість. При цьому миші зберігали координацію рухів. Не було порушень дефекації, сечовипускання та інших ознак нейротоксичності. Стан слизових, шерстяний покрив та охайність залишалися без змін. Протягом наступних 14 діб спостереження за тваринами не виявлено змін в поведінці та загальному стані тварин. Спостерігалася і позитивна динаміка маси тіла (табл. 2). Зважування робили на 1, 7 та 14-ту добу після введення препарату. Результати зважування трьох піддослідних груп мишей, кожна з яких складалася з 6 особин, наведені в табл. 2.

Таблиця 2

Динаміка маси тіла тварин в різних дослідних групах після введення нанокмпозитного комплексу ЕМАР II з декстраном 70

	група I (300 мкг/кг), Г	група II (1000мкг/кг),Г	група III (10 000мкг/кг), Г	контроль, Г
1 доба	23,57±2,3	24,17±1,4	24,23±0,8	24,07±1,2
7 доба	24,67±2,5	25,58±1,2	25,82±1,5	25,73±1
14 доба	27,62±1,2	27,2±0,9	28,33±1,1	27,77±0,6

При дослідженні можливої хронічної токсичності нанокмпозитного комплексу ЕМАР II з декстраном 70 на мишах, під час якої протягом 30 діб щоденно вводили комплекс в концентраціях 300 мкг/кг та 1000 мкг/кг було проаналізовано вагу внутрішніх органів тварин (табл. 3). Макроскопічне дослідження внутрішніх органів мишей показало, що препарат не викликає у піддослідних тварин виражених патологічних декструктивних змін в їх органах. Також не було виявлено різниці у вазі контрольних та піддослідних мишей.

Таблиця 3

Дослідження маси внутрішніх органів тварин після введення нанокмпозитного комплексу ЕМАР II з декстраном 70 протягом 30 діб

	група I (300 мкг/кг), Г	група II (1000 мкг/кг), Г	контроль, Г
серце	0,25±0,02	0,24±0,02	0,24±0,01
печінка	1,98±0,05	1,82±0,03	1,8±0,02
нирки	0,37±0,05	0,36±0,02	0,37±0,02
селезінка	0,14±0,02	0,14±0,03	0,15±0,02
легені	0,35±0,05	0,38±0,05	0,32±0,02

В результаті проведених нами досліджень показано, що нанокмпозитний комплекс ЕМАР II з декстраном 70 не проявляє загальних токсичних властивостей на організм мишей і не викликає їх загибель при високих концентраціях комплексу.

Дослідження впливу комплексу ЕМАР II з декстраном 70 на ксенотрансплантанти аденокарциноми простати людини у мишей лінії СВА. При дослідженні протипухлинної активності цитокіну ЕМАР II в концентрації 10 мкг/кг та його комплексу з декстраном 70 спостерігалось інгібування росту пухлин на 71 та 77 % відповідно. Гістологічні дослідження показали, що під впливом як цитокіну ЕМАР II, так і його комплексу з декстраном 70 в дозі 10 мкг/кг спостерігаються виражені деструктивні зміни. Ефекти були близькі до посткастраційних (рис.8). Контрольна група

включала 20 ксенографтів пухлин, трансплантованих під капсулу нирки мишей лінії СВА.

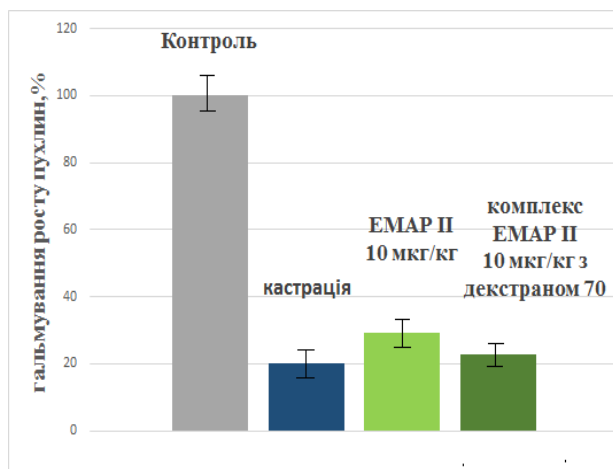


Рис. 8. Вплив цитокіну ЕМАР II та його комплексу з декстраном 70 на приріст маси ксенографтів аденокарциноми простати людини у мишей

Вплив комплексу ЕМАР II з декстраном 70 на проліферацію та апоптоз. При культивуванні культур клітин Нер-2 в присутності нанокompatитного комплексу ЕМАР II з декстраном 70 спостерігали пригнічення росту культури клітин (рис.9) до 94% за концентрацій комплексу ЕМАР II 10 мкг/мл та 20 мкг/мл.

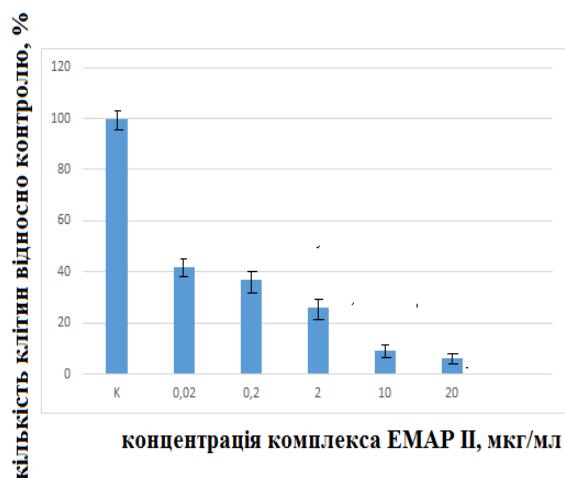


Рис. 9. Цитотоксичний вплив комплексу ЕМАР II з декстраном 70 на культуру клітин Нер-2 *in vitro*

Культура клітин 4BL6 виявилася менш чутливою до дії нанокompatитного комплексу. Результати свідчать про вплив комплексу ЕМАР II з декстраном 70 на клітинну проліферацію, яка, ймовірно, пов'язана із здатністю поліпептида ЕМАР II індукувати апоптоз, що знайшло підтвердження при використанні методу TUNEL в культурі клітини LNCaP (культура клітин раку простати людини).

Результати проведених досліджень показують, що завдяки біотехнологічній розробці комплексу протипухлинного цитокіна ЕМАР II з декстраном 70 підвищено стабільність білка із збереженням його основних біологічних властивостей, що може бути важливим для подальших досліджень ЕМАР II та його доклінічних випробувань.

ВИСНОВКИ

В дисертаційній роботі вперше створено нанокмпозитний комплекс ендотеліального та моноцитаривуючого поліпептида II (EMAP II) з декстраном 70. Визначено оптимальні умови експресії рекомбінатного білка EMAP II в бактеріальній системі експресії. Запропонований можливий механізм агрегації цитокіна EMAP II та шляхи її запобігання в комплексі з декстраном 70. Декстран 70 стабілізує структуру цитокіна EMAP II в комплексі. Проведено низку експериментів щодо встановлення властивостей нанокмпозитного комплексу EMAP II з декстраном 70.

1. Розроблена генноінженерна технологія отримання протипухлинного цитокіна EMAP II в препаративних кількостях. Оптимізовані умови експресії EMAP II та показано, що найбільший вихід рекомбінатного білка спостерігається при культивуванні культури *E.coli* BL21(DE3)pLysE на мінімальному поживному середовищі A, час інкубації культури після індукції 4,5 год., оптимальна концентрація індуктора IPTG в середовищі 1,25 мМ.

2. Показана стабілізація цитокіна EMAP II в комплексі з декстраном 70. Створено температурностабільний комплекс цитокіна EMAP II з декстраном 70. Стехіометрія комплексу 1:1, $K_d = 1,97 \pm 0,17 \mu\text{M}$. При утворенні комплексу з декстраном 70 середня температура локального конформаційного переходу в EMAP II підвищується від 43 °C до 49 °C.

3. Вивчено агрегаційні властивості цитокіна EMAP II методом світлорозсіювання. Показано, що полісахарид декстран 70 перешкоджає процесам агрегації білка в діапазоні температур 20 – 55 °C.

4. Тест на пірогенність показав, що комплекс EMAP II з декстраном 70 містить менше, ніж 0,5 МОЕ/кг, але більше 0,03 МОЕ/кг ліпополісахаридів.

5. Показано, що комплекс EMAP II з декстраном 70 в концентраціях 1,6 - 25 мкг/мл стимулює продукцію фактора некрозу пухлин та не впливає на продукцію інтерферону у культурі клітин.

6. Дослідження токсичності отриманого комплексу EMAP II з декстраном 70 на тваринах в концентраціях 300 мкг/кг, 1 000 мкг/кг та 10 000 мкг/кг показали, що він не викликає летального ефекту.

7. Проведено порівняння протипухлинної активності EMAP II та його комплексу з декстраном 70 на ксенографтах аденокарциноми простати людини у мишей в дозі 10 мкг/кг та показано інігібування росту пухлин відповідно на 71% та 77%.

ПЕРЕЛІК НАУКОВИХ ПРАЦЬ, ОПУБЛІКОВАНИХ ЗА ТЕМОЮ ДИСЕРТАЦІЇ

1. **Kolomiets L. A., Vorobyova N. V., Lozhko D. M., Zayets V.N., Kornelyuk A. I.** (2020) Stabilization of AIMP1/p43 and EMAP II recombinant proteins in the complexes with polysaccharide dextran-70. *Pharmacological Reports*, 72(1), 238-245. DOI: 10.1007/s43440-019-00016-x. (Особистий внесок здобувача – проведено виділення та очистку цитокіну ЕМАР II, створено нанокмпозитний комплекс ЕМАР II та АІМР1/р43 з декстраном 70, дослідження утворених комплексів методами флуоресцентної спектроскопії, написання та подання рукопису до друку).
2. **Коломієць Л.А., Ложко Д.М., Чуніхін О.Ю., Заєць В.М., Гордовська Н.В., Корнелюк О.І.** (2019) Вплив декстрану-70 на агрегацію протипухлинного цитокіну ЕМАР II. *Мікробіологія і біотехнологія*, 3 (47), 6 - 18. DOI: 10.18524/2307-4663.2019.3(47).182815. (Особистий внесок здобувача – проведено виділення та очистку білка ЕМАР II, створено нанокмпозитний комплекс ЕМАР II з декстраном 70, дослідження утворення агрегатів методом динамічного світорозсіювання, обробка та узагальнення результатів експериментів, написання рукопису та подання до друку).
3. **Коломієць Л., Заєць В., Корнелюк О.** (2018) Дослідження впливу нанокмпозитного комплексу цитокіну ЕМАР II з декстраном 70 на організм мишей лінії Balb/c. *Вісник Київського національного університету імені Тараса Шевченка, серія біологія*, 2(76), 29-33. DOI: 10.17721/1728_2748.2018.76.29-33. (Особистий внесок здобувача – експресія та очистка рекомбінантного білка ЕМАР II, створення нанокмпозитного комплексу ЕМАР II з декстраном 70, проведено власноруч експерименти з тваринами, аналіз та обробка результатів експериментів, написання рукопису та подання до друку).
4. **Kolomiets-Babenko L.A., Bohorad-Kobelska O. S., Kovalchuk N. L., Spivak M. Ja., Kornelyuk A. I.** (2016) Nanocomposite Complex EMAP II Influence on Tumor Necrosis Factor and Interferon. *Biotechnologia Acta*, 9 (5), 18-23. DOI: 10.15407/biotech9.05.018. (Особистий внесок здобувача – проведено виділення та очистку цитокіну ЕМАР II, створено нанокмпозитний комплекс ЕМАР II з декстраном 70, участь в експерименті з культурами клітин, обробка та аналіз результатів досліджень, написання статті та подання до друку).
5. **Чайковская Л.В., Полякова Л.И., Сачинская О.В., Бабенко Л.А., Корнелюк А.И., Резников А.Г.** (2011) Тестирование противоопухолевой активности нанокмпозитного комплекса рекомбинантного цитокинподобного полипептида ЕМАР-II на ксенотрансплантатах андрогензависимого рака предстательной железы человека. *Эндокринология*, 16 (2), 160-168. (Особистий внесок здобувача – проведено виділення та очистку цитокіну ЕМАР II, створено нанокмпозитний комплекс ЕМАР II з декстраном 70, участь у експериментах по підсадці ксенографтів пухлини під капсулу нирки мишей, здійснено аналіз та обробку отриманих результатів).
6. **Lylo V., Matsevich L., Kotsarenko E, Babenko L., Kornelyuk A., Lukash L.** (2011) Activation of gene expression of the O⁶-methylguanidine-DNA-transferase repair enzyme upon the influence of EMAP II cytokine in human cells *in vitro*. *Cytology and Genetics*, 45 (6), 373-378. DOI: 10.3103/S0095452711060053. (Особистий внесок здобувача – проведено виділення та очистку білка ЕМАР II, участь у експериментах, здійснено аналіз отриманих результатів).

7. **Бабенко Л.А.**, Скоробогатов О.Ю., Дубровський О.Л., Корнелюк О.І. (2010) Оптимізація бактеріальної експресії протипухлинного цитокіна ЕМАР II в клітинах *E.coliBL21(DE3)pLysE*. *Мікробіологія і біотехнологія*, 3 (11), 21-31. DOI: 10.18524/2307-4663.2010.3(11).98933 (Особистий внесок здобувача – аналіз літературних джерел, проведення оптимізації бактеріальної експресії цитокіна ЕМАР II, аналіз і узагальнення результатів, написання та підготовка рукопису до друку).

8. Голобородько Т.О., Полякова Л.І., Соткіс Г.В., Корнелюк О.І., **Бабенко Л.А.**, Шуба Я.М., Рєзніков О.І. (2010) Поліпептид ЕМАР II гальмує ріст і стимулює апоптоз клітин лінії LNCaP раку простати людини. *Журнал АМН України*, 16(4), 681-690. (Особистий внесок здобувача – проведено виділення та очищення цитокіна ЕМАР II, здійснено аналіз отриманих результатів).

9. Корнелюк О.І., **Бабенко Л.А.**, Козлов О.В., Рєзніков О. Г., Чайковська Л.В., Полякова Л.І. Нанокмпозитний протипухлинний препарат: патент на корисну модель № 64374; заявл.18.03.2011, Опубл. 10.11.2011, Бюл. № 21 (Особистий внесок здобувача – аналіз патентної документації, біотехнологічна розробка та створення нанокмпозитного комплексу, підбір оптимальних концентрацій білка та ліганду, опис патенту та ведення документації).

10. **Коломієць Л.А.**, Малина А.Е., Корнелюк О.І. Спосіб стабілізації протипухлинного цитокіна ЕМАР II: патент на корисну модель № 141271; заявл. 24.10.2019, Опубл. 25.03.2020. (Особистий внесок здобувача – аналіз патентної документації, біотехнологічна розробка та проведення експериментів по стабілізації протипухлинного цитокіна ЕМАР II, опис патенту та ведення документації).

11. **Бабенко Л.А.**, Чайковська Л.В., Рєзніков О. Г., Корнелюк О. І. (2010 вересень) Дослідження протипухлинної дії цитокіна ЕМАР II на ксенотрансплантанти аденокарциноми простати людини у мишей лінії СВА. - X Український біохімічний з'їзд, 13-17 вересня, Одеса. (Опубл. В *Ukr. Biochem. J.*, 2010, (Спеціальний випуск), том 82, №4, С.49).

12. **Babenko L.A.**, Chaykovskaya L.V., Polyakova L.I., Reznikov A.G., Kornelyuk A. I. (2010 February) Antitumor activity of II protein. - FEBS Special Meetings JakStat Signaling: From Basics to Disease, University of Veterinary Medicine Vienna, Vienna, Austria (Опубл. в *Abstract book*, 2010, P.53).

13. **Бабенко Л.А.**, Скоробогатов О.Ю. (2010 вересень) Оптимізація бактеріальної експресії протипухлинного цитокіна ЕМАР II в клітинах *E.coliBL21(DE3)pLysE*. - VI Міжнародна наукова конференції студентів і аспірантів «Молодь і поступ біології», Львів, Україна (Опубл. в *Збірник тез*, 2010, С.143-144).

14. **Бабенко Л.А.**, Козлов О.В., Чайковська Л.В., Полякова Л.І., Рєзніков О. Г., Корнелюк О. І. (2011 березень) Створення нанокмпозитного препарату ЕМАР II та дослідження його протипухлинної активності. - Міжнародна наукова конференція студентів та молодих вчених «Актуальні питання сучасної медицини», 24-26 березня, Харків, Україна (Опубл. в *Збірник тез*, 2011. С. 25-26).

15. Скоробогатов О.Ю., **Бабенко Л.А.**, Корнелюк О. І (2011 березень) Визначення імуногенних ділянок рекомбінантного білка ЕМАР II

біоінформатичним методом. . - Міжнародна наукова конференція студентів та молодих вчених «Актуальні питання сучасної медицини», 24-26 березня, Харків, Україна (Опубл. в *Збірник тез*, 2011. С. 158-159).

16. **Бабенко Л.А.**, Коцаренко Е.В., Лыло В.В., Мацевич Л.Л., Рубан Т.А., Корнелюк А.И., Лукаш Л.Л. (2011) Изучение влияния нанокompозитного препарата ЕМАР II на пролиферацию и выживаемость иммортализованных клеток. - Международная Пушинская школа-конференция молодых ученых «Биология наука XXI века, Пушино, Россия (Опубл. в *Сборник тезисов* 2011, С.300).

17. **Babenko L.A.**, Reznikov A. G., Chaykovskaya L. V., Kornelyuk A. I. (2011 June) Investigation of anticancer activity of ЕМАР II based nanocomposite complex. - 36th FEBS Congress "Biochemistry for tomorrow's medicine", 25 - 30 June, Torino, Italy (Опубл. *Abstract book* 2011, P.196).

18. Goloborodko T., Polyakova L., Sotkis A., Moriev R., Kornelyuk A., **Babenko L.**, Shuba Y., Reznikov A. (2011 June) Effect of recombinant protein ЕМАР II on proliferation and apoptosis in the prostate cancer LNCaP cell line. - 36th FEBS Congress "Biochemistry for tomorrow's medicine", 25 - 30 June, Torino, Italy (Опубл. *Abstract book* 2011, P.209).

19. Коцаренко К.В., Лыло В.В., Мацевич Л.Л., Рубан Т. А., **Бабенко Л. А.**, Корнелюк А. И., Лукаш Л. Л. (2011 травень) Вплив цитокінів на експресію гена *MGMT* в клітинах людини *in vitro*. - П'ята Конференція молодих вчених інституту молекулярної біології і генетики НАН України, присвячена 130-річчю від дня народження О.О. Богомольця, 24-25 травня Київ, Україна (Опубл. *Біополімери і клітина*, 2011. № 4. С. 318).

20. Kotsarenko K., **Babenko L.**, Ruban T., Lylo V., Kornelyuk A., Lukash L. (2011 September) Study of ЕМАР II based nanocomposite complex affect on the survival of human cell *in vitro*. - The 4th International IMBG Conference for Young Scientists "Molecular Biology Advances and Perspectives", 14-17 September, Kyiv. (Опубл. в *Abstract book* P. 99).

21. **Коломієць Л.А.**, Ковальчук Н.Л. (грудень 2015) Визначення вмісту ендотоксинів у нанокompозитному препараті ЕМАР II методом гел-тромб тесту. – X Міжнародна конференція молодих науковців «Біологія: від молекули до біосфери», 2-4 грудня 2015, Харків, Україна. (Опубл. в *Збірник тез*, 2015. С. 128).

22. Воробйова Н. В., **Коломієць-Бабенко Л. А.**, Ложко Д. М., Нестеренко Є.В. (2016 жовтень) Дослідження формування комплексів рекомбінантних білків АІМР1/Р43 та ЕМАР II людини із декстраном-70. - XI міжнародна конференція молодих учених «Біологія: від молекули до біосфери», Харків, Україна. (Опубл. в *Збірник тез*, 2016. С. 29).

23. **Коломієць Л.А.**, Ложко Д.М., Чуніхін О.Ю., Заєць В.М., Гордовська Н.В., Корнелюк О.І. (2019) Вплив декстрану-70 на агрегацію протипухлинного цитокіну ЕМАР II. - XII Український біохімічний конгрес, 30 вересня-4 жовтня, Тернопіль, Україна. (Опубл. в *Медична та клінічна хімія*, 2019, Т.21, № 3 (80), С.272).

АНОТАЦІЯ

Коломієць Л.А. Створення та характеристика нанокompозитного комплексу протипухлинного цитокіна ЕМАР ІІ з декстраном 70. - Кваліфікаційна наукова праця на правах рукопису.

Дисертація на здобуття наукового ступеня кандидата біологічних наук за спеціальністю 03.00.20 - біотехнологія – Інститут молекулярної біології і генетики Національної Академії Наук України, ННЦ «Інститут біології та медицини» Київського національного університету імені Тараса Шевченка, Київ, 2020.

Дисертаційна робота присвячена дослідженню стабілізації білків, зокрема ендотеліального та моноцитаактивуючого поліпептида ІІ, дослідженню механізмів його агрегації, способам запобігання агрегації та стабілізації білка. Розроблена генноінженерна технологія отримання протипухлинного цитокіна ЕМАР ІІ в препаративних кількостях. Оптимізовані умови експресії ЕМАР ІІ в бактеріальній системі *E.coli*.

Вперше створено нанокompозитний комплекс ЕМАР ІІ з декстраном 70, показана його роль в стабілізації білка, біологічна активність комплексу на культурах клітин та на тваринах.

Запропоновано можливий механізм агрегації цитокіну ЕМАР ІІ, який полягає у взаємодії неструктурованої петлі ³⁴DVGEIAPR⁴¹ молекули білка з гідрофобною триптофановою “кишенню” на поверхні іншої молекули білка.

Показано, що ймовірним механізмом стабілізації білкової глобули ЕМАР ІІ декстраном 70 згідно даних комп'ютерного моделювання структури комплексу ЕМАР ІІ з полісахаридом є блокування декстраном 70 потенційних сайтів на поверхні білка, відповідальних за утворення агрегатів білка.

Ключові слова: ендотеліальний моноцит активуючий поліпептид ІІ (ЕМАР ІІ), декстран 70, агрегація білків, нанокompозитний комплекс, стабілізація білка, комп'ютерне моделювання.

SUMMARY

Kolomiets L. A. Creation and characterization of a nanocomposite complex of antitumor cytokine EMAP II with dextran 70. – Qualification scientific work with the manuscript copyright.

Thesis for obtaining the degree of Doctor of Philosophy (PhD) in Biology, speciality 03.00.20 - Biotechnology. – ESC "Institute of Biology and Medicine" of Taras Shevchenko National University of Kyiv, Institute of Molecular Biology and Genetics of National Academy of Sciences of Ukraine, Kyiv, 2020.

Endothelial monocyte activating polypeptide II (EMAP II) is a cytokine capable of exhibiting anti-angiogenic action, inducing expression of TNF and

interleukin-8, causing apoptosis of endothelial cells. The precursor to EMAP II is the p43 protein, a component of the high molecular weight complex of higher eukaryotic aminocyl-tRNA synthetases. EMAP II ability to inhibit neoangiogenesis and stimulate cancer cell apoptosis has become the basis for investigating whether it can be used as an anticancer drug. The antitumor effect of EMAP II has been experimentally demonstrated on different types of tumors. Recent studies have shown that EMAP II causes a dose-dependent inhibition of cell proliferation and initiates apoptosis of lymphocytes, which targets cytotoxic activity of EMAP II. The antitumor effect of EMAP II has been experimentally demonstrated on different types of tumors. Recent studies have shown that EMAP II causes a dose-dependent inhibition of cell proliferation and initiates apoptosis of lymphocytes, which targets cytotoxic activity of EMAP II. At high doses, anti-angiogenic effects of cytokine and other properties that counteract the growth of tumor tissues, such as increased apoptosis, procoagulative activity, etc. are manifested.

Proteins and protein preparations are widely used in medical practice in the treatment of various diseases. The main problem with the use of proteins as drugs is their instability, high ability to aggregate and low degree of solubility. The most effective way of combating the problem of aggregation is to use variety of ligands that prevent aggregation. Dextran belongs to the family of natural polysaccharides that are widely used in clinical and preclinical studies with a well-characterized safety profile. Dextran is also used in nanomedicine, which uses submicron particles for therapeutic and diagnostic purposes. Dextran is also used to protect and stabilize the unique structure of the proteins (e.g., albumin, streptokinase, asparagine, insulin, hemoglobin).

The bacterial expression of EMAP II cytokine and preparation of recombinant protein in preparative amounts were optimized. It was shown that the optimal conditions for cytokine expression are the cultivation of bacterial culture of *E. coli* BL21 (DE3) pLysE on the minimal medium A. In the course of EMAP II cytokine expression the maximum amount of protein was observed if the inductor was added to the culture medium for the second hour of culture and the optimal concentration of the inducer of the synthesis IPTG was 1.25 mM. The highest increase in expression of the target protein was observed in the culture of 4.5 h induction. A highly purified EMAP II cytokine was obtained to further construct its complex with the ligand and to study its characteristics.

The recombinant EMAP II protein was titrated with dextran 70 solution. The change of fluorescence intensity of the protein was observed with increasing ligand concentration, which indicates the strong binding of the ligand to the recombinant protein and the formation of a stable complex. This indicates the stabilization of EMAP II structure in the complex, which is more resistant to high temperatures compared to free protein.

Dynamic light scattering was used to study the effect of dextran 70 on the aggregation of the cytokine EMAP II. It was shown that the complex EMAP II with dextran 70 is quite strong and stable, the polysaccharide dextran 70 stabilizes

the EMAP II protein globule and prevents aggregation processes. To understand the nature of the aggregates formation of EMAP II protein, we modeled the interaction between the spatial structures of the protein using Cluspro 2.0 and SymmDock web servers for the macromolecular docking. The analysis of spatial structures revealed that one of the key roles in the formation of contacts between protein molecules in the structure of protein-protein complexes was played by the unstructured loop ³⁴DVGEIAPR⁴¹, which blocks the hydrophobic tryptophan pocket.

In order to identify a potential dextran binding site of the surface of EMAP II, the flexible docking was performed using the AutoDock Vina software. According to models obtained in the binding of dextran 70 to EMAP II involved such residues as Arg12, Gly36, Glu37, Ile38, Arg41, Lys68, Lys71, Met72, Arg73, Leu76, Lys116, Asn119, Lys121, Lys123, Trp125, Lys166.

When checking the nanocomposite preparation EMAP II with dextran 70 for the presence of lipolysaccharides, it was found that the preparation contained less than 0.5 IU/kg but more than 0.03 IU/kg.

Toxicological testing of LD50 complex EMAP II with dextran 70 was performed on Balb/c laboratory mice. It was shown that after the infusion of the EMAP II complex with dextran 70 to mice at doses of 300 - 10 000 µg/kg no general toxic effect of the complex was not observed and it does not cause animal death.

Using the PST cell culture (piglet testicles), it was shown that the complex of EMAP II with dextran 70 induces the production of TNF-α in the concentration range from 1.6 to 25.0 µg/ml. Interferon production by the cell cultures was not detected upon treatment with EMAP II complex with dextran 70. It was shown that dextran 70 does not affect TNF-α production.

On the model of transplanted fragments of human prostate adenocarcinoma complex EMAP II with dextran 70 with a concentration of 10 µg/kg, it was found that the complex provided 77% inhibition of the tumor growth progress.

Key words: endothelial monocyte activating polypeptide II (EMAP II), dextran 70, protein aggregation, nanocomposite complex, protein stabilization, computer simulation.