

НАЦІОНАЛЬНА АКАДЕМІЯ НАУК УКРАЇНИ
ІНСТИТУТ МОЛЕКУЛЯРНОЇ БІОЛОГІЇ І ГЕНЕТИКИ

На правах рукопису

КОЧУБЕЙ ТЕТЯНА ОЛЕКСАНДРІВНА

УДК 575.113: 575.224

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

03.00.03 – молекулярна біологія

Дисертація на здобуття наукового ступеня
кандидата біологічних наук

Науковий керівник:
Півень Оксана Олександрівна,
кандидат біологічних наук,
старший науковий співробітник.

Київ – 2017

ЗМІСТ

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ СКОРОЧЕНЬ	5
ВСТУП	6
РОЗДІЛ 1. ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ	13
1.1. Загальна характеристика апоптозу.	13
1.2. Пошук активаторів апоптозу для таргетної терапії онкологічних захворювань.	17
1.3. Лектини - потенційні модулятори апоптозу.	24
1.4. Лектини грибів та рослинного походження, що здатні індукувати апоптоз.	25
1.4.1. Лектин фітопатогенного гриба (<i>Sclerotium rolfsii</i>).	25
1.4.2. Лектин купини запашної (<i>Polygonatum odoratum</i>).	25
1.4.3. Лектин омели білої (<i>Viscum Album</i>).	26
1.4.4. Конканавалін А.	28
1.4.5. Лектин сої культурної (<i>Glycine hispida</i>).	29
1.4.6. Лектин клематису (<i>Clematis montana</i>).	30
1.4.7. Лектин квасолі звичайної, фітогемаглютинін (<i>Phaseolus vulgaris</i>).	30
РОЗДІЛ 2. МАТЕРІАЛИ І МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕНЬ	34
2.1. Культивування клітин.	34
2.2. Опис біологічних, хімічних агентів та обладнання, що використовувались у роботі	35
2.2.1. Біологічні агенти.	35
2.2.2. Хімічні агенти.	36
2.2.3. Обладнання.	36
2.3 Дослідження впливу сумарного препарату ФГА та його ізолектинів на проліферацію культур клітин в умовах in vitro	37
2.4 Кількісне визначення життєздатності клітин та обрахування	39

апоптичного індексу

2.5. Докінг аналіз можливої взаємодії РНА-L та рецепторів клітинної мембрани та характеристика енергетики такого зв'язування 41

2.6. Дослідження впливу лектинів на зміни рівня експресії білків - медіаторів апоптозу 42

2.6.1. Визначення концентрації білка за методом Бредфорда 44

2.6.2. Електрофоретичне розділення білків у ПААГ 44

2.6.3. Вестерн-блот аналіз (імуноблотинг).

2.7. Аналіз змін рівня експресії про- та антиапоптичних генів у культурах клітин ссавців під дією сумарного препарату ФГА та його ізолектинів. 46
47

2.8. Статистичний аналіз.

РОЗДІЛ 3. ДОСЛІДЖЕННЯ ВПЛИВУ СУМАРНОГО ПРЕПАРАТУ ЛЕКТИНУ ФГА ТА ЙОГО ОКРЕМИХ ІЗОЛЕКТИНІВ НА ПРОЛІФЕРАЦІЮ ТА АПОПТОЗ КЛІТИН ССАВЦІВ. 49

3.1. Дослідження впливу лектинів ФГА на проліферацію та виживаність культур клітин в умовах *in vitro*. 50

3.2. Кількісний аналіз життєздатності клітин. Аналіз морфологічних змін ядерного апарату клітин. 54

РОЗДІЛ 4. ДОСЛІДЖЕННЯ МОЛЕКУЛЯРНИХ МЕХАНІЗМІВ ІНДУКЦІЇ АПОПТОЗУ КЛІТИН ССАВЦІВ СУМАРНИМ ПРЕПАРАТОМ ФГА ТА ЙОГО ОКРЕМИМИ ІЗОЛЕКТИНАМИ 71

4.1. Вплив сумарного препарату ФГА та його окремих ізолектинів на вміст активованих каспаз та проапоптичного білка Вах 71

4.2. Дослідження змін експресії проапоптичних та антиапоптичних генів (*Bax* та *Bcl2*) у клітинах ссавців під впливом лектинів ФГА. 80

РОЗДІЛ 5. МОЛЕКУЛЯРНЕ МОДЕЛЮВАННЯ БЛОК-БІЛКОВОЇ ВЗАЄМОДІЇ ЛЕЙКОАГЛЮТИНІНУ 85
3

ПРОАПОПТИЧНИМИ ТА АНТИАПОПТИЧНИМИ РЕЦЕПТОРАМИ	92
КЛІТИННОЇ МЕМБРАНИ	
РОЗДІЛ 6. АНАЛІЗ І УЗАГАЛЬНЕННЯ РЕЗУЛЬТАТІВ	102
ДОСЛІДЖЕНЬ	
ВИСНОВКИ	103
СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ	121
ДОДАТКИ	

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ СКОРОЧЕНЬ

БСА	альбумін сироватки бика
ДНК	дезоксирибонуклеїнова кислота
кДНК	комплементарна ДНК
ЕДТА	етилендіамінтетраацетат
МННГ	N-Метил-N-нітро-N-нітрозогуанідин
ПААГ	поліакриламідний гель
ПЛР	полімеразна ланцюгова реакція
ТХО	трихлороцтова кислота
ФГА	фітогемаглютинін (сумарний препарат)
ФГА-Л	лейкоаглютинін
ФГА-Е	еритроаглютинін
РНК	рибонуклеїнова кислота
мРНК	матрична рибонуклеїнова кислота
dNTP	дезоксирибонуклеотидтрифосфат
GAPDH	гліцеральдегід-фосфат-дегідрогеназа
MMC	мітоміцин С
MNNG	N-Метил-N-нітро-N-нітрозогуанідин
TEMED	N, N, N', N'- тетраетилендіамін

ВСТУП

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 злякисних 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 виключно у злякисних клітинах [1, 2]. 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 про-апоптичним потенціалом. І серед таких, особливу увагу привертає група широко розповсюджених 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 [3, 4]. 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 [5], 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, вперше таку його властивість описано ще на початку 60-х років ХХ століття, також було показано і його еритроаглютинуючу та лейкоаглютинуючу дії [6]. 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 п'яти різних комбінаціях [6]. Цікавим є те, що окрім мітогенної дії ізолектини цього білка 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 пухлин свідчить про метастазування та прогресію пухлини [7]. 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 підтверджене експериментально іншими авторами. Було показано здатність еритроцитарного ізолектину червоної квасолі індукувати апоптоз у культурі клітин раку легенів людини [8]. 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, 2009-2010pp.)

Мета та 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: 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.

Предмет 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 етидіум бромідом та акридиновим помаранчевим. Для біоінформатичного аналізу можливих взаємодій лектинів ФГА та рецепторів клітинної мембрани застосували метод молекулярного докінгу. Статистичні методи аналізу: t-критерій Ст'юдента, χ -квадрат.

Наукова новизна одержаних результатів. Вперше показано дозозалежний вплив ізолектинів фітогемаглютиніну на проліферацію клітин ссавців та встановлено здатність лектинів індукувати гибель клітин як злоякісних, так і умовно нормальних ліній за умов експерименту. Вперше виявлено здатність ізолектинів фітогемаглютиніну індукувати програмовану гибель 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 фактору некрозу пухлини – TNF1R) так і «антиапоптичними» рецепторами (рецептором інсуліноподібного фактору росту – IGF1R та рецептором епідермального фактору 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 виконанні 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 й 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 було 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. 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.

РОЗДІЛ 1

ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ

1.1. Загальна характеристика апоптозу

Протягом останніх десятиріч дослідженням механізмів загибелі клітин присвячено велику кількість наукових праць. І це цілком логічно, оскільки розуміння біологічного та генетичного змісту загибелі клітини має не лише фундаментальне значення для розвитку біології клітини, а й цілком практичне застосування. Нині виділяють декілька типів смерті клітини, а саме: некроз, апоптоз і автофагія. Апоптоз – це АТФ-залежний генетично врегульований процес видалення клітин, що має власні механізми. Ці механізми залучають плазматичну мембрану, ядро, мітохондрії, ендоплазматичний ретикулум, апарат Гольджі, лізосоми та цитоплазму. Варто зауважити, що при апоптозі не ушкоджуються сусідні клітини і не розвивається запальна реакція, так як це відбувається при некрозі. Спричинити апоптоз можуть як фізіологічні, так і низка патологічних факторів та зовнішніх чинників. Тож, у багатоклітинному організмі, завдяки активації механізмів апоптозу, можуть гинути і нормальні, неушкоджені клітини (напр., під час ембріогенезу), і патологічно змінені, присутність яких створює певну небезпеку для організму.

Останнім часом, накопичується все більше свідчень того, що порушення регуляції апоптозу можуть бути однією із причин виникнення та розвитку різних захворювань. Це можуть бути онкологічні, автоімунні, серцево-судинні, гастроентерологічні, алергійні, інфекційні захворювання, нейродегенеративні розлади, СНІД, цукровий діабет та ін.

Тож, апоптоз – важливий біологічний процес запрограмованої гибелі клітини, що має принципове значення і при ембріогенезі, і при розвитку умовно нормальної клітини, і при розвитку патології. Вивчення механізмів запрограмованої гибелі клітин, та пошук біологічних молекул та/або хімічних сполук, що здатні специфічно модулювати активацію та перебіг

апоптозу у клітині мають величезне значення для практичного застосування у сучасній медицині [9].

Апоптоз або запрограмована смерть клітини – це енергетично-залежний, поширений фізіологічний процес, що генетично контролюється еволюційно консервативними генами, продукти яких можуть як активувати, так і супресувати його [10]. В результаті апоптозу органели клітини не руйнуються, мембрана зберігає свою ригідність, відбувається конденсація хроматину, характерна міжнуклеосомна фрагментація ДНК і утворення типових апоптичних тілець, які фагоцитуються сусідніми здоровими клітинами або макрофагами. За даними A.G. Renehan та співавторів, доросла людина втрачає кожного дня приблизно 10 млрд. клітин [11]. За нормальних умов у організмі існують чотири основні потреби в апоптозі: для підтримки сталої кількості клітин; для визначення форми організму та його частин; для забезпечення правильного співвідношення кількості клітин різних типів; для видалення генетично дефектних (мутованих) клітин.

У подальших дослідженнях було показано, що аномальна стійкість до апоптозу є однією з головних ознак злоякісної трансформації клітин. Крім цього було встановлено зв'язок між формуванням у пухлинних клітинах стійкості до апоптозу та втратою їхньої чутливості до медикаментів.

Згідно сучасних уявлень, процес апоптозу можна розділити на три фази: 1) фаза ініціації (або сигнальна фаза), під час якої відбувається активація поверхневих рецепторів смерті (рецепторний шлях ініціації апоптозу), та/або внутрішньоклітинних проапоптичних молекул (мітохондріальний шлях ініціації апоптозу); 2) фаза передачі сигналу (або підготовча фаза), відбувається активація ініціаторних каспаз та кіназ/фосфатаз; 3) фаза виконання (або фаза смерті), під час якої відбувається активація ефекторних каспаз.

Залежно від механізмів ініціації апоптозу (Додаток А), розрізняють два основних апоптичних шляхи: зовнішній, або рецепторний, який запускається активацією мембранних рецепторів смерті, та внутрішній, або мітохондріальний, який включає в себе

появу та/або активацію проапоптичних молекул під дією внутрішньоклітинних стресових сигналів. Обидва шляхи ведуть до активації ефektorної каспази - каспази-3, що призводить до незворотних морфологічних та біохімічних змін у клітині [12].

У хребетних апоптоз реалізується переважно за рахунок активації мітохондріального шляху [10, 13]. Ключову роль при внутрішньому (мітохондріальному) шляху апоптозу відіграють білки сімейства Bcl-2 (B-cell lymphocytic-leukemia proto-oncogene), куди входять антиапоптичні члени – Bcl-2, Bcl-xL та проапоптичні – Bax, Bak, Bim та Bid [14]. Під дією внутрішньоклітинних стресових стимулів проапоптичні білки цього сімейства вбудовуються у зовнішню мембрану мітохондрій та олігомеризуються. Внаслідок такої взаємодії відбувається підвищення проникності зовнішньої мембрани мітохондрій та вочевидь її руйнація [13]. Після чого відбувається вивільнення ти вихід у цитоплазму цілої низки апоптогенних молекул, включаючи цитохром *c* та фактор індукції апоптозу AIF (apoptosis inducing factor).

Окрім зазначених молекул із мітохондрій також вивільняються Smac (second mitochondria-derived activator of caspase), DIABLO (direct IAP Binding protein with Low pI), ENDOG (Endonuclease G) та HtrA2 (2Omi/high temperature requirement protein A) [15].

Цитохром *c*, знаходячись в цитоплазмі, взаємодіє з білком Araf-1 (apoptotic protease activation factor-1) і запускає його АТФ-залежну олігомеризацію [16]. Далі цей комплекс, приєднує прокаспазу-9, і у такий спосіб утворюється апоптосома – активаційний комплекс каспази-9. Активована каспаза-9 запускає протеолітичне дозрівання прокаспаз-3, а каспаза-3, у свою чергу, запускає каскад реакцій, що неминуче ведуть до клітинної смерті [17]. На відміну від цитохрому *c*, AIF може підсилювати дію таких алкілувальних агентів як MNNG та транслокуватися в ядро і запускати зміни в ядрі, що також приводять до загибелі клітини [18]. З іншого боку, Smac/DIABLO та/або Omi/HtrA2 зв'язуються із білками-інгібіторами каспаз – IAP (inhibitory apoptotic

proteins), що призводить до дисоціації останніх із каспазами 3 та /або 9 та як наслідок – їхньої активації [15,19].

Зовнішній (рецепторний) шлях апоптозу починається із активації плазматичних мембранних білків-рецепторів сімейства TNF (фактор некрозу пухлин - tumor necrosis factor), відомих іще як рецептори смерті. Нині найбільш вивченими рецепторами смерті є CD95 (також відомий як Fas (Fas Cell Surface Death Receptor) або APO-1) та TNFR1 (відомий іще як p55 або CD120a). До додаткових також належать рецептори DR3 (англ. death receptor 3), DR4/ TNFRSF10A та DR5/TNFRSF10B [20, 21]. Усі рецептори смерті це трансмембранні білки, що характеризуються наявністю спільної послідовності із 80 амінокислот у цитоплазматичному домені. Саме ця послідовність називається доменом смерті (англ. death domain або скорочено DD) і є необхідною для трансдукції сигналу апоптозу. Позаклітинні домени рецепторів смерті взаємодіють із тримерами до яких відносяться: CD95L, TNF, Apo3L, Apo2L та інші. У результаті такої взаємодії відбувається «зшивання» 3-х молекул рецептору (тримеризація), що призводить до його активації [20]. Після чого, активований рецептор може зв'язуватись із внутрішньоклітинними адапторами, або адаптором і взаємодіяти із ефекторами – і ще неактивними попередниками протеаз із родини каспаз - прокаспазами. У результаті таких молекулярно-біологічних подій формуються агрегати у яких і відбувається активація каспази-8 або каспази-10 (рис.1.2). Такі агрегати ще називають апоптосомами, апоптичними шаперонами або сигнальними комплексами, що індукують смерть.

Каспаза-8 в свою чергу запускає каспазний каскад реакцій або може розщеплювати білок Bid з утворенням активної вкороченої форми tBid (truncated Bid), останній приймає участь у пермеабілізації мітохондрії, і, таким чином, пов'язує зовнішній та внутрішній шляхи апоптозу в деяких типах клітин [22].

Узагальнюючи, варто зауважити, що апоптоз є складним та високорегульованим енергетично-залежним процесом, що характеризується

специфічними морфологічними та біохімічними змінами принципову роль у яких відграє активація каспаз. Нині ідентифіковано низку ключових білків, що здатні активувати, або навпаки пригнічувати апоптоз у клітині, однак повної картини молекулярних взаємодій у клітині поки що не існує. Проте важливість розуміння механізмів апоптозу є надзвичайно актуальним завданням сучасної науки, оскільки апоптоз є необхідним компонентом як підтримки балансу здорового організму так і розвитку патології. Навіть більше, широке залучення апоптозу клітини до розвитку багатьох захворювань робить весь цей механізм та його окремі ключові молекули потенційними мішенями при проведенні терапії нейродегенеративних, онкологічних, автоімунних та інших патологій людини.

1.2 Пошук активаторів апоптозу для таргетної терапії онкологічних захворювань.

Нормальний гомеостаз окремої клітини та цілого організму підтримується за рахунок балансу між поділом клітин та їхньою смертю. Порушення механізмів контролю апоптозу у клітині призводить до виникнення різних патофізіологічних процесів, онкологія та автоімунні захворювання – це класичний приклад наслідків таких порушень. При деяких нейродегенеративних захворюваннях (хвороба Альцгеймера, хвороба Паркінсона і Хантінгтона) зазвичай спостерігається порушення функціонування мітохондрій, ендоплазматичного ретикулуму та накопичення білків із порушеним фолдингом. При зазначених патологіях деякі нейрони гинуть через підвищений рівень апоптозу і, як наслідок, відбувається критичне порушення тканини головного мозку [23]. При ураженнях тканини внаслідок реперфузії (ішемія, інфаркт) відбувається підвищення міжклітинного кальцію та ROS, у свою чергу ці фактори спричиняють вивільнення AIF із подальшою транслокацією його у ядро. Такі події призводять до каспазозалежного апоптозу у клітині [1]. Якщо при згаданих вище патологіях заблокувати перебіг апоптозу, то прогноз буде

більш сприятливим для пацієнта. Порушення тканини головного мозку чи ураження серця будуть менш драматичними.

З іншого боку, пригнічення темпу апоптозу або зменшення чутливості клітини до сигналів смерті призводить до накопичення клітин із генетичними мутаціями та канцерогенезу. Існує ціла низка причин, що призводять до резистентності малігнізованих клітин до апоптозу, узагальнюючи існуючі нині концепції можемо виділити наступні [1]: 1) порушення балансу між проапоптичними та антиапоптичними білками у клітині; 2) пригнічення функціонування каспаз; 3) порушення прийняття та трансдукції сигналів смерті (Додаток Б).

Активація апоптозу виключно у ракових клітинах виглядає досить привабливим підходом у терапії онкологічних захворювань. Нині, на підґрунті існуючих знань про молекулярні механізми апоптозу та його основних чинників постійно ведеться пошук молекул як природного, так і синтетичного походження, що здатні активувати апоптоз у клітині діючи на ті чи інші ланки сигналіngu.

Залежно від того, яка ланка апоптозу обирається у якості мішені, створено і кілька підходів та стратегій до відновлення чутливості клітин до апоптичних стимулів (Додаток В). Вони включають активацію як каспазозалежного, так і мітохондріального шляхів апоптозу. Важливою групою мішеней для проведення протипухлинної терапії є проапоптичні рецептори – TRAIL (Fas або APO-1). Відомо що TRAIL, як було описано вище ініціює каспазозалежний механізм апоптозу, до того ж його активність не залежить від статусу p53 [24, 25].

Привабливість рецептору TRAIL у якості потенційної мішені для створення засад протипухлинної цільової терапії полягає у тому, що ліганд FasL має цитотоксичну активність щодо багатьох пухлинних клітин, однак використання його суттєво обмежене через гепатотоксичність останнього. Тож нині створено два антагоністи проапоптичних рецепторів (PARAs - pro-apoptotic receptors antagonists), дія яких спрямована на DR4 або DR5 [24]. Рекombінантний Apo2L/TRAIL людини активує обидва рецептора, в той час як моноклональні антитіла діють як агоністи DR4 (maratumumab) та DR5

(Ixatumumab, Aromab, AMG655, Cs-1008, LBY-135) [26, 27]. Обидва підходи характеризуються високою ефективністю ініціації апоптозу у ракових клітинах і мають мінімальні побічні ефекти. Наразі тривають клінічні випробування і пептиду Aро2L/TRAIL і моноклональних антитіл, також розпочато клінічне випробування їхньої комбінованої дії із відомими хіміопрепаратами.

«Страж геному» або білок p53 досить добре вивчений регулятор апоптозу, відомо, що більше ніж у 50% відомих нам онкологічних захворювань виявляють порушення експресії/функції цього онкосупресору [28]. Саме тому цей ген і білок є важливою мішенню для розробки стратегій протипухлинної терапії. Всі існуючі на сьогоднішній день стратегії можна розділити на три категорії: 1) генна терапія, 2) імунотерапія і 3) застосування хімічних препаратів (Додаток В). Варто зауважити, що методи генної протипухлинної терапії, що спрямовані на ген p53 були запропоновані досить у 1996 році. Групою вчених було показано, що введення дикотипного гена p53 у складі ретровірусного вектору відновлює чутливість клітин карциноми легень людини до апоптичних чинників [29]. Наразі методи генної терапії, що ґрунтуються на застосуванні векторних систем проходять до клінічні випробування, однак існує і інший цікавий підхід – використання генетично модифікованих вірусів, що спричиняють елімінацію p53 дефіцитних клітин [1, 30].

Засади протипухлинної імунотерапії націленої на p53 ґрунтуються на застосуванні вакцин, різного походження. [1, 31]. Усі ці методи перебувають на стадії клінічного випробування.

Створено також і низку хімічних агентів, що здатні відновлювати онкосупресорну функцію p53, залучаючи різні механізми. Так, наприклад, Фікан 083 та похідні карбазолу здатні специфічно розпізнавати мутований p53, зв'язуватись із ним та відновлювати його функцію [32]. Інший клас хімічних агентів, наприклад CP-31398, інтеркалює у ДНК дестабілізуючи коровий домен комплексу ДНК-p53, що приводить до відновлення функції мутованого p53 [33]. Хімічні агенти нутлінс, MI-219 та теновінс також здатні

відновлювати функцію мутованого p53, однак опосередковано, через пригнічення взаємодії MSM2-p53 [34].

Як вже згадувалось вище, однією із причин виникнення резистентності пухлин до апоптичних стимулів є порушення балансу про- та анти-апоптичних білків родини Bcl-2. Нині існує кілька підходів для відновлення або маніпуляції балансом між цими білками для ініціації апоптозу у малігнізованих клітинах (Додаток В). А саме: 1) хімічні інгібітори експресії антиапоптичних генів родини Bcl-2 (*Bid, Bim, Puma, Noxa, Bad, Bmf, Hrk, Bik, Bax, Bak, Bok/Mtd*); застосування імітаторів домену проапоптичних білків BH3); застосування антисенсових олігонуклеотидів та коротких інтерферуючих РНК (siРНК). До першої групи речовин відносяться бутират натрію, депсипептид, фенретинід та флавіпіродол [35]. Відомо, що злоякісні клітини, внаслідок виникнення генних мутацій або активації онкогенів експресують антиапоптичні білки родини Bcl-2 на вищому рівні, ніж умовно нормальні клітини [36]. Речовини, що імітують BH3 домен здатні вибірково та високо специфічно зв'язуватись із гідрофобною борозенкою антиапоптичних білків та ініціювати програмовану гибель клітини. Класичний приклад такої взаємодії це АВТ-737, імітатор домену BH3, він здатен інгібувати антиапоптичні білки: Bcl-2, Bcl-xL та Bcl-W. Цитотоксична дія цього агенту була показана як із використанням ліній культур клітин лімфоми та дрібноклітинної карциноми легень, так і із первинними клітинами отриманими від пацієнтів, а також у дослідах із модельними тваринами [37]. Інші представники цієї групи агентів, такі як ATF4, ATF3 та NOXA, вибірково інгібують білок Mcl-1, що також призводить до ініціації мітохондріального шляху апоптозу [38].

Альтернативою застосування хімічних інгібіторів антиапоптичних білків є протипухлинна терапія із використанням антисенсових олігонуклеотидів або siРНК. Так було показано, що введення у культуру клітин карциноми специфічних siРНК призводило до пригнічення проліферації клітин та відновлення їхньої чутливості до дії апоптичних стимулів, спостерігали також специфічне приглушення експресії генів родини Bcl-2 [39]. Іншою групою авторів було показано, що застосування

специфічних siРНК проти Bmi-1 підвищувало чутливість лінії клітин раку молочної залози MCF до дії доксорубіцину і підвищувало рівень апоптозу у клітинах пухлини як *in vitro* так і *in vivo* [40].

Розглядаючи стратегії маніпулювання балансом між проапоптичними та антиапоптичними білками варто зупинись і на підходах протипухлинної терапії, що націлені безпосередньо на мітохондрію. Завдяки дослідженням кількох останніх декад були встановленні структурні та функціональні відмінності між мітохондріями умовно нормальних та злоякісних клітин. Ці принципові відмінності і слугують у якості мішеней для проведення протипухлинної терапії. Запропоновано, навіть новий термін «Мітокан» - це акронім двох слів – мітохондрія та канцер і об'єднує він речовини, що здатні спричиняти дестабілізацію мітохондрій вибірково у злоякісних клітинах [41]. Низка таких речовин успішно проходить доклінічні та ранні клінічні випробування. Умовно їх можна поділити на два класи за принципом дії: OxPhos інгібітори та ROS регулятори. До перших відносяться делокалізуючі ліпофільні катіони (DLCs), завдяки своїй ліофільності та позитивному заряду, DLCs здатні накопичуватись у мітохондріях виключно злоякісних клітин і врешті решт ініціювати мітохондріальний шлях апоптозу [41]. ROS регулятори також проявили себе як ефективні протипухлинні агенти у експериментах *in vivo* та *in vitro*. Відомо, що у пухлині рівень ROS зазвичай вищий порівняно із умовно нормальними клітинами, і цей рівень сприяє розвитку і / або підтримці злоякісного фенотипу. Проте саме підвищений рівень ROS робить малігнізовану клітину більш уразливою до необоротного окисного пошкодження та призводить до її загибелі. Тому, фармакологічні засоби, які або збільшують виробництво ROS, або інгібують активність поглинає ROS ефективно підвищують рівень апоптозу у ракових клітинах [42]. Пригнічення або блокування функції білків - інгібіторів апоптозу (IAPs - inhibitor of apoptosis proteins) також застосовується для проведення ефективної протипухлинної таргетної терапії. Найбільш перспективними у цьому сенсі є білки XIAP та Survivin.

Для пригнічення функції цих білків застосовують специфічні короткі інтерферуючі РНК (siRNA). Експериментально було показано, що

приглушення експресії XIAP у злоякісних клітинах різної етіології підвищувало їхню чутливість до – хіміо- та радіотерапії і опромінення [43, 44]. Також було показано, що приглушення експресії XIAP або Survivin у клітинах гепатоми за допомогою siRNA підвищувало чутливість цих клітин до активації рецепторів смерті та дії хіміопрепаратів [45]. Ефективність пригнічення експресії Survivin за допомогою siRNA та антисенсових олігонуклеотидів було продемонстровано із застосуванням широкого ряду пухлин, автори спостерігали пригнічення росту та проліферації клітин а також ініціацію апоптозу [1]. Окрім того розроблено та запропоновано методи інгібування експресії Survivin із використанням хімічних інгібіторів та методів генної терапії [46].

Відомо, що клітина має і власні механізми контролю активності білків групи IAPs, так Smac/DIABLO (Second mitochondria-derived activator of caspase/direct inhibitor of apoptosis-binding protein with low pI) - один із багатьох білків, що вивільняються із мітохондрії у відповідь на сигнали апоптозу. У цитозолі він інгібує білки XIAP, cIAP-1 та cIAP-2, які досить часто експресуються активніше саме у злоякісних клітинах [47]. Синтез і застосування пептидів, що імітують функцію Smac/DIABLO мають величезний потенціал у якості терапевтичних агентів. Нещодавно було показано, що синтетичний пептид Smac/DIABLO-N7 суттєво підвищує чутливість пухлин до дії хімічних препаратів (доксорубіцин та тамоксифен) та опромінення [48].

Як зазначалось вище, принципову роль у регуляції апоптозу відіграють каспази, і відновлення та/або активація їхньої функції у клітині є наступною важливою стратегією проведення протипухлинної терапії. Протягом останніх років було створено та розроблено низку синтетичних агентів, здатних активувати каспази (Додаток В). Серед таких – апоптин, що вибірково індукує апоптоз саме у малігнізованих клітинах активуючи каспазу -3 та -8, [49]. Інший клас речовин - активаторів каспаз, це синтетичні пептиди, що містять АГА (arginin-glycine-aspartate) мотив. Ці пептиди здатні індукувати авто-активацію прокаспази-3, що призводить до апоптозу ракових клітин [50]. Окрім синтетичних пептидів та хімічних препаратів здатних активувати

каспази створено і методи генної терапії. Введення гена конститутивно активної форми каспази-3 у клітини пухлини печінки лінії AN130 та у клітини гепатоми людини лінії HuH7 підвищувало інтенсивність апоптозу та підвищувало чутливість клітин до дії хімічних агентів [51, 52]. Протионкологічні ефекти спостерігали також як у моделях *in vitro* так і *in vivo* після введення у клітини карциноми рекомбінантного аденовірусного вектору, що експресував каспазу-3 [53].

Відносно новою стратегією проведення протипухлинної терапії є застосування мікро РНК (міРНК) – коротких некодуючих РНК, що здатні регулювати у клітині безліч генів, сигналінгів, та як наслідок, гомеостаз клітини. Останнім часом накопичено низку даних щодо участі міРНК у регуляції як мітохондріального так і рецепторного шляхів апоптозу [54]. У виникненні та прогресії пухлини міРНК можуть виступати і у якості супресорів і у якості онкогенів. Тож відновлення функції чи контенту міРНК у клітині може суттєво пригнічувати прогресію пухлини. Таргетна терапія проти міРНК може досить ефективно використовуватись як самостійно так і у поєднанні із відомими хімічними агентами. У останньому випадку очікується зниження резистентності пухлин до хіміотерапії. Основні підходи – це пригнічення онкологічних міРНК та активація міРНК – супресорів пухлинного росту. Участь міРНК у регуляції апоптозу та їхнє потенційне застосування детально розглянуто Pileczki та співавторами [54].

Тож пошук синтетичних чи природніх молекул, здатних модулювати апоптоз, є надзвичайно актуальним завданням. І незважаючи на те, що вже створено низку синтетичних агентів та біополімерів для подолання резистентності пухлини до апоптичних стимулів, робота у цьому напрямку не зупиняється. Варто зауважити, що коли говориться про потенційне клінічне застосування тієї чи іншої стратегії/речовини, треба враховувати не лише високспецифічну цитотоксичність, а й безпечність для інших клітин та організму пацієнта. Важливою компонентою є також і економічна складова – потенційна речовина, чи стратегія повинна бути не занадто дорогою і легко відтворюваною. Тому, останнім часом увагу дослідників привертають

біологічні сполуки, що здатні модулювати апоптоз. І серед таких, група широко розповсюджених білків - лектинів.

1.3. Лектини - потенційні модулятори апоптозу

На сьогоднішній день дослідниками виявлена велика кількість біологічних ресурсів, які можуть бути потенційними протипухлинними препаратами. Серед цих речовин можна виокремити групу білків - лектинів як тваринного так і рослинного походження. Лектини (від латинського *legere* – вибирати) це група білків не імунної природи, що здатні зворотно і вибірково зв'язувати вуглеводи і вуглеводні детермінанти біополімерів без зміни їхньої ковалентної структури [55].

Існує декілька підходів до класифікації лектинів: за походженням (лектини рослин або фітолектини, грибів, мікроорганізмів, вірусів та тварин); зв'язані та незв'язані з мембранами клітин; лектини, специфічні для органу, тканини або клітини певного живого організму, тощо.

За будовою молекули лектини підрозділяють на чисті білки, глікопротеїни, металопротеїни, а також за числом субодиниць, що входять до складу молекули - мономери, димери, тетраметри та інші [6].

Лектини, досить специфічні білки, і наразі повністю їхня роль у клітині не з'ясована. Нині відомо, що тваринні лектини найчастіше залучені до клітинних взаємодій, тоді як рослинні лектини беруть участь у захисті рослини від патогенів та потенційних хижаків [6].

Беручи до уваги захисні властивості цих речовин було показано здатність рослинних лектинів індукувати апоптоз у злоякісних клітинах, що робить їх перспективними для лікування раку (Додаток Г). Останніми роками з'ясовано, що лектини можуть індукувати апоптоз різними шляхами ініціюючи каспази, впливаючи на експресію генів, що залучені до апоптозу. Так було встановлено, що лектин омели-І здатен регулювати певні мікро РНК, які у свою чергу інгібують рибосом-інактивувальні протеїни (RIPs) [56, 57]. Варто зауважити, що не всі білки в родині лектинів обов'язково викликають апоптоз. Багато лектинів виявляють себе як біомаркери,

вказуючи на раннє виявлення злоякісних пухлин [58], або можуть індукувати автофагію [59].

Є дані про те що лектин купини звичайної можуть індукувати обидва процеси в клітинах раку молочної залози як апоптоз, так і автофагію [60].

1.4. Лектини грибів та рослинного походження, що здатні індукувати апоптоз

1.4.1. Лектин фітопатогенного гриба (*Sclerotium rolfsii*). Лектин фітопатогенного гриба *Sclerotium rolfsii* має два різні сайти зв'язування з вуглеводами: первинний і вторинний. GalNAc зв'язується на основному сайті, в той час як GlcNAc зв'язується тільки на вторинному сайті. Структура білка складається з двох бета-шарів, які складаються з чотирьох і шести бета-ниток, з'єднаних двома альфа-спіралями [61]. Із використанням культур клітин було показано, що лектин *Sclerotium rolfsii* дозозалежно гальмував проліферацію і індукував апоптоз у клітинах раку молочної залози людини ліній MCF-7 та ZR-75. Незначну інгібувальну проліферацію дію лектин виявляв і в умовно нормальних клітинах молочної залози людини ліній MCF-10A та HMEC. За допомогою мічення лектину фітопатогенного гриба біотином було виявлено здатність цього білка зв'язатись із злоякісними та умовнонормальними тканинами молочної залози, однак ефективність зв'язування у першому випадку була значно вищою [62].

1.4.2 Лектин купини запашної (*Polygonatum odoratum*). Лектин купини запашної (*Polygonatum odoratum*) був виділений з кореневищ рослини, він має тривимірну структуру та складається з мінорного та мажорного фрагментів.

Саме мажорний компонент має проапоптичні властивості та є манозоспецифічним. Мінорний компонент взаємодіє з N-ацетил нейраміною кислотою та сіалоглікопротеїнами [6]. Аналіз первинної структури лектину виявив певні амінокислотні послідовності, які є притаманними усім лектинам родини лілійних, включаючи лектин

підсніжника звичайного *Galanthus nivalis*, і саме ці послідовності пов'язують з протипухлинними властивостями згаданої групи білків [63].

Було виявлено, що лектин купини запашної викликав апоптоз у культурі клітин легенів людини A549. У той же час, автори не спостерігали зменшення обсягу і фрагментацію ДНК у культурі умовно нормальних клітин легень HELF. Детальний аналіз молекулярних механізмів дії лектину купини виявив, що цей білок здатен індукувати як мітохондріальний так і каспазозалежний шлях апоптозу, а також і інший вид клітинної загибелі – автофагію [64]. В експерименті з культурою клітин A549 було показано, що після обробки лектином у концентрації 23 мкг/мл протягом 24 годин відбувається пригнічення поділу майже 50% клітин. Експериментально було з'ясовано що у культурі клітин раку легенів A549 обробка лектином купини звичайної спричиняла активацію мітохондріально-опосередкованого шляху апоптозу, відомого також як Akt-NF- κ B шлях. Вибірковість індукції апоптозу у злоякісних клітинах лінії A549 та відсутність її у умовно нормальній лінії клітин HELF робить цей лектин перспективним з точки зору проведення таргетної терапії раку легень [65].

У іншій роботі із використанням культури клітин саркоми миші L929 було встановлено, що лектин у концентрації 25 мкг/мл індукував апоптоз активуючи каспазозалежний шлях [66]. Окрім того, лектин купини індукував як апоптоз так і автофагію у культурі клітин раку молочної залози MCF-7 залучаючи рецептор епідермального фактору росту та Ras-Raf-MEK-ERK опосередкований сигнальний шлях [60]. Лектин купини звичайної мав високу антипроліферативну дію по відношенню до культури клітин фібросаркоми миші L929 та індукував каспазозалежний шлях та мітохондріальний шляхи апоптозу клітин [65].

1.4.3. Лектин омели білої (*Viscum Album*). Екстракти лектинів з омели звичайної є досить добре вивченими і відомими саме завдяки своїй проапоптичній дії у пухлинах різного виду та походження. Однак, варто зауважити, що його дія має виражені концентраційні залежності, що робить його застосування досить суперечливим. Велика кількість досліджень вказує на проапоптичні ефекти лектину омели для певних доз, у той час як інші

концентрації мають антиапоптичні наслідки. Так, при обробці Т-лімфоцитів лектином омели у концентрації 1-8 ng/mL та мононуклеарних клітин периферійної крові 2-8 нг/мл спостерігали інгібування проліферації, тоді як вищі концентрації (4-16 pg/mL, 4-32 pg/mL) навпаки індукували проліферацію для мононуклеарних клітин периферійної крові і Т-лімфоцитів відповідно. Обробка клітин лектином у концентрації 10 ng/mL у присутності антитіл CD3/CD28 підвищувала відсоток апоптичних клітин до 26% через 48 годин після інкубації [66]. Незважаючи на це, лектин використовується для створення та розробки антипухлинних препаратів і один із них - ISCADOR. Так на тваринній моделі було показано, що обробка ліній клітин гліобластоми миші (LNT-229 та LN-308) препаратом ISCADOR у концентрації 100 мкг/мл призводила до зменшення експресії генів що залучені до прогресування гліобластоми, а саме: інтегрину $\alpha 5$ (ITGA5), сурвівіну (BIRC5), рецептору фактору росту гепатоцитів (MET/HGFR), в тому числі і трансформуючого фактору росту - β (TGF- β 1) [67].

Цей препарат широко використовується у Європі для лікування пацієнтів, які хворі на рак [68]. Описано поодинокі випадки успішного використання препарату у післяопераційний період при терапії метастатичної меланоми [69].

Усього розрізняють три лектини омели, які позначають як I, II, і III, що мають певні відмінності і потребують подальшого вивчення [6]. Для лектину корейської омели (*Viscum album var. Coloratum*) було показано апоптичну активність щодо клітин раку молочної залози людини. Цікаво, що проапоптична дія цього лектину була ефективнішою у поєднанні із препаратом доксорубіцином. При поєднанні препарату лектину омели та доксорубіцину спостерігали сильний синергетичний ефект в інгібуванні клітинного росту у клітинах раку молочної залози двох ліній : MCF-7 (естроген-рецептор-позитивні) та MDA-MB231 (естроген-рецептор-негативні). Крім того, при об'єднанні препаратів експресія проапоптичних білків, включаючи Вах, Вік, і Рума була підвищена в обох клітинних лініях, тоді як рівень експресії Bcl-2 в клітинах MCF-7 - знижувався. Як відомо, доксорубіцин має обмежене клінічне використання оскільки для нього

показані побічні ефекти, він може викликати міелосупресії та є кардіотоксичним [70]. Тож, поєднання лектину та доксорубіцину дає змогу проводити терапію з застосуванням менших концентрацій останнього, нівелюючи таким чином побічні ефекти.

Лектин корейської омели викликав апоптоз в SK-Ner-1 (p53-позитивних) і Ner 3В (p53-негативних) клітинах гепатокарциноми людини через активацію p53- і p21-незалежних шляхів, зменшуючи рівень Bcl-2 та підвищуючи рівень Вах білків, активуючи каспазу-3 в обох клітинних лініях [71].

Описано інші клітинні лінії, які є чутливими до проапоптичної дії лектину омели. При цьому варто зауважити, що індукція апоптозу у кожній окремій клітинній лінії відбувається різними шляхами. Так, клітини гострого лімфобластного лейкозу та клітини гліобластоми зазнають НК-опосередкованого лізису, клітини гепатоми та карциноми – через p53- і p21-незалежний мітохондріальний шлях, мононуклеарні клітини периферійної крові шляхом активації проапоптичних білків, моноцити пухлинної лінії клітин за допомогою активації експресії індивідуальних інтерлейкінів, а епідермальні клітини карциноми шляхом індукції дефосфорильованого Акт [72, 73].

Тож підсумовуючи ці експериментальні дані можна сказати, що лектин омели здатен спричиняти апоптоз впливаючи на різні ланки сигнально-регуляторних шляхів клітини.

Перспективність лектину омели у якості протипухлинного препарату було доведено і у досліджах *in vivo*. Так із застосуванням модельних мишей було показано, що рекомбінантний лектин омели підвищував виживаність тварин з важким комбінованим імунодефіцитом (SCID) після трансплантації клітин раку яєчників людини [74].

1.4.4. Конканавалін А. Конканавалін А – лектин канавалії мечевидної (*Canavalia ensiforme*) родини бобових. Цей лектин є відомим мітогеном щодо Т-лімфоцитів [6]. Однак, незважаючи на встановлену мітогенну дію цього білка, було показано, що він здатен індукувати каспазозалежний апоптоз у клітинах меланоми людини A375 [75]. Автори спостерігали вихід цитохрому

с, збільшення кількості розщеплених каспази-9 і каспази-3 післядії цього лектину. Окрім того у клітинах A375 реєстрували порушення трансмембранного потенціалу мітохондрій. Ці результати свідчать на користь того, що конканавалін А активує мітохондріальний шлях апоптозу [75].

Іншою групою вчених із застосуванням культури клітин гліобластоми та у HeLa клітинах було з'ясовано, що конканавалін А здатен індукувати і автофагію клітин через активацію мітохондріального шляху [76, 77]. Отримані результати узгоджуються з даними, які були отримані з використанням тварин. Так, з використанням мишачої моделі *in vivo*, було показано пригнічення проліферації у клітинах меланоми B16 і фібробластів 3T3 лектином конкаваліну [78]. Однак варто зауважити, що введення конканаваліну А мишам ліній BALB/c, SCID та SCID/NOD у дозах 20, 30 та 40 мг/кг індукувало гострий гепатит. В той же час у печінці тварин лінії SCID/NOD відзначали автофагію [79].

Саме тому клінічне застосування Con A є досить складним питанням через його високу цитотоксичність, яка досить часто асоційована з розвитком гепатиту, що є небезпечним для хворих на рак [79, 80].

1.4.5. Лектин сої культурної (*Glycine hispida*). Лектини сої – це класичний лектин, що міститься в сім'ядолях і в зародковій осі насіння рослини [81]. Це метало протеїн, що містить іони кальцію та марганцю [6]. Лектин сої є слабо токсичним для людини та тварин. Невеликі дози білка, при згодовуванні щурам, мали вплив на баланс азоту в організмі, а при великих дозах - спостерігалась гіпертрофія підшлункової залози [82]. Лектин сої проявляв низьку цитотоксичність відносно клітинних ліній гепатоми людини, хоріокарциноми, меланоми миші та остеосаркоми щурів [83]. Про цитотоксичну дію щодо різноманітних лейкоцидних клітин свідчать дослідження інших авторів [84]. Окрім того, було показано, що дія цього білка не обмежується індукцією апоптозу, так лектин сої викликав і автофагію та пошкодження ДНК, підвищуючи генерацію активних форм кисню у клітинах HeLa. Цікаво, що у цих же експериментах, N-ацетилцистеїн послаблював дію лектину [85].

1.4.6. Лектин клематису (*Clematis montana*). Лектин клематису є манозозв'язуючим лектином, за своєю структурою - це гомодимер, з масою 11,968.9 Да. Лектин гемаглютинує еритроцити кролика та індукує апоптоз у пухлинних клітинах [86]. Нещодавно було з'ясовано, що цей лектин має противірусну активність та значну інгібуючу дію на ріст клітин у культурах ліній L929, HeLa, MCF7 і HepG2 [87].

1.4.7. Лектин квасолі звичайної, фітогемаглютинін (*Phaseolus vulgaris*). Лектин квасолі звичайної є одним із найбільш досліджених лектинів рослинного походження. Мітогенна активність лектину квасолі звичайної, була виявлена на початку 60-х років ХХ століття і спонукала активне вивчення біологічної активності цих білків [6]. В подальших дослідженнях було виявлено, що лектин квасолі звичайної складається з ізолектинів, які можна розділити іонообмінною хроматографією [88]. Кожен з ізолектинів є глікопротеїном з молекулярною масою 115 кДа, і складаються з чотирьох субодиниць (рис 1.1), що утримуються разом за рахунок не ковалентних сил [6]. Еритроаглютинін (ФГА-Е) вміщує чотири ідентичні субодиниці, лейкоаглютинін [89] вміщує інші чотири ідентичні субодиниці, суміш субодиниць, або не розділений фітогемаглютинін (ФГА) називають сумарним. ФГА-Л – гомогенний глікопротеїн, що складається з однакових субодиниць, з молекулярною масою 31кДа, вся молекула має масу 126кДа. Ізолектин позбавлений сірковмісних амінокислот, але вміщує високий процент аспарагінової кислоти, лейцину, серину, треоніну та валіну. Для прояву його біологічної активності потрібні іони кальцію та марганцю.

ФГА-Л характеризується значною хімічною стійкістю[90], та високою термостійкістю при нейтральних та кислих значеннях рН. Лектини ФГА були виділені з багатьох видів квасолі звичайної, отримані препарати мали молекулярну масу 120-130 кДа та 7 - 9 % вуглеводів у своєму складі, також характеризувались подібним амінокислотним складом. Однак, було з'ясовано, що отримані лектини відрізнялись за еритроаглютинуючою, лейкоаглютинуючою та мітогенною активностями [6].

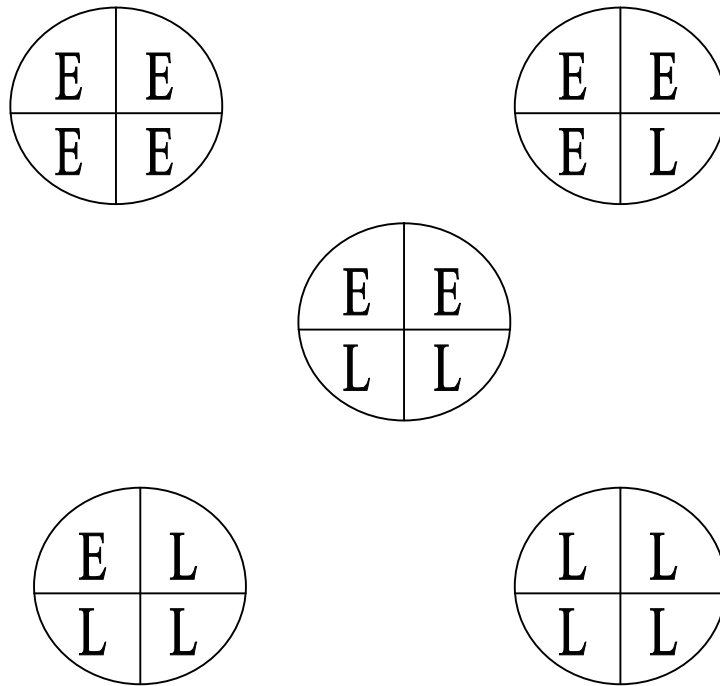


Рис.1.1. Схематична репрезентація тетрамерної структури 5 ізолектинів *Ph. vulgaris* [6]

Подальші дослідження показали важливу роль аспарагінової та глютамінової амінокислот та тирозинових залишків для реалізації мітогенної активності фітогемаглютиніну. В той час як залишки лізину не впливали на цю активність [91]. Також показано, що ФГА-Л, на відміну від ФГА-Е, може розпізнавати три- і тетраантенні β -1-6-N-ацетилглюкозамінні залишки N-гліканів, підвищення експресії яких свідчить про метастазування та прогресію пухлин молочної залози та товстої кишки [7]. ФГА-Е має сильну афінність до еритроцитів та аглютинуює еритроцити курки, собаки, людини, миші, щура, кролика та гуски [6].

Мітогенна активність ФГА робить його важливим реагентом для клінічної діагностики та проведення цитологічних досліджень. Зокрема ФГА використовують при проведенні хромосомного аналізу, дослідженнях функції лімфоцитів при різноманітних захворюваннях та продукування ними різних біологічно активних речовин - лімфокінів, інтерферонів, тощо[92].

Для організму ссавців ФГА не є токсичним, проте вживання в їжу сирих насінин несприятливо впливає на ріст організму. Так, при введенні у раціон щурів сирого насіння квасолі спостерігалась затримка росту,

зниження засвоєння азоту та порушення всмоктування у кишечнику [93]. У іншій роботі [94] було показано, що ФГА сильно пригнічує секрецію кислоти базальними клітинами шлунку. В експериментах на щурах це пригнічення становило 72 % порівняно з контролем. ФГА подавляв стимулюючий вплив пентагастрину та гістаміну на виділення кислоти пропорційно введений дозі лектину, але в той же час не впливав на секрецію шлунком пепсину [94]. Також вважають, що лектин пошкоджує глікокалікс ентероцитів та викликає їхнє ушкодження [93]. Включення в їжу молодим щурам нестиглого насіння квасолі протягом десяти днів призводило до зменшення жирових відкладень та маси скелетних м'язів і це дозволило зробити припущення, що мішенню ФГА є саме ліпідний катаболізм. У таких тварин також знижувався рівень інсуліну в плазмі крові, проте рівень глюкози залишався стабільним. Автори вважають що ФГА можна рекомендувати в невеликих дозах для зменшення гіперглікемії та жирових відкладень [95].

Токсичність лектинів квасолі вивчалась також із застосуванням інших модельних організмів. Було показано, що лектин квасолі є токсичним для деяких жуків, що поїдають насіння злаків та бобових [6]. В той же час він не виявляв значного токсичного впливу на личинки томатної молі *Lacanobia oleracea*, яких годували штучно препаратом, що містив 2% (m/v) ФГА-Е та ФГА-Л від загального білка [96]. Нещодавно було показано деякий негативний вплив вказаних лектинів на організм людини, який проявлявся у здатності ФГА індукувати харчові алергії [97].

Одночасно з цим було виявлено певні лікувальні властивості розчинів ФГА при застосуванні їх для прискорення загоєння ран різної етіології [98]. Зокрема позитивний ефект дії лектинів показано при загоєнні виразок після променевого ураження [99], що обумовлено стимуляцією Т-лімфоцитів та посиленою продукцією лімфокінів.

Нещодавно показано [8] здатність еритроцитарного ізолектину червоної квасолі ФГА-Е індукувати апоптоз мітохондріальним шляхом у культурі клітин раку легенів людини. Проте залишається невідомим, чи лише еритроцитарна ізоформа ФГА здатна індукувати апоптоз, а також які шляхи індукції апоптичних процесів залучені до реалізації такої дії лектинів ФГА.

Узагальнюючи огляд літератури, можна зауважити, що вивчення механізмів апоптозу, пошук потенційних мішеней для пригнічення або відновлення чутливості клітин до апоптичних стимулів має і фундаментальне і практичне застосування. Надзвичайно важливим напрямком сучасної науки є пошук та створення речовин і агентів які здатні вибірково та специфічно впливати на ключові ланки апоптозу. Лектини, із їхньою здатністю вибірково зв'язувати певні вуглеводи на поверхні клітини та активувати як мітохондріальний, так і рецептор-залежний шляхи апоптозу є досить перспективною групою білків для розробки засад протипухлинної терапії. Однак, здатність лектинів індукувати апоптоз у клітинах ще не достатньо добре з'ясована, а саме не існує повної картини молекулярно-біологічних та генетичних взаємодій у клітині, що передують ініціації апоптозу у разі дії білків цієї групи.

Тож метою дисертаційної роботи було дослідити проапоптичні властивості сумарного препарату фітогемаглютиніну та його окремих ізолектинів у культурі клітин ссавців.

РОЗДІЛ 2

МАТЕРІАЛИ І МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕНЬ

Експериментальна частина дослідження проведена із використанням культур клітин ссавців в умовах *in vitro*. А саме, спонтанно трансформованих фібробластів китайського хом'ячка *Bld-ii-FAF28Cl237-8Glu^{tsIII}*, лінії клітин карцинами гортані людини Нер-2, а також отриманої у відділі лінії клітин людини непухлинного походження 4BL [100]. Дві перші лінії є добре дослідженими та стандартними біологічними системами для вивчення мутагенезу, апоптозу та інших біологічних процесів. Культура клітин 4BL не пухлинного походження, була отримана з крові здорового донора людини. Тож використання клітин різного походження та ступеню диференціювання дає змогу як найглибше дослідити дію лектинів на проліферацію та апоптоз.

2.1. Культивування клітин

У роботі використовували мінімальне культуральне середовище Ігла у модифікації (MEM, Sigma, США) із додаванням проінкубованої при 56⁰С ембріональної сироватки великої рогатої худоби (ЕС, Sigma, США) у 3 та 5 % концентраціях. При клонуванні клітин на повноцінному середовищі та вирощуванні їх у селективних умовах вміст сироватки підвищували до 10 %.

Клітини пересівали через кожні 2 – 4 доби із використанням 0,26 % розчину трипсину з версеном (Біотестлабораторія, Київ). Клітини культивували із додаванням антибіотиків: пеніциліну та стрептоміцину (по 100 од./мл).

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 (концентрація CO₂ у газовій суміші становить 5 %) підтримується рівень рН на рівні 7,2 – 7,4. Культивували клітини при температурі +36,0 – +36,5⁰С.

2.2. Опис біологічних, хімічних агентів та обладнання, що використовувались у роботі

2.2.1. Біологічні агенти. 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).

За своєю структурою сумарний препарат фітогемаглютиніну (ФГА) містить суміш різних ізолектинів. Ізолектини, ФГА-Е - еритроцитарна форма та ФГА-Л -лейкоцитарна форма, за своєю структурою є тетрамерами, що складаються з Е- та L- субодиниць, молекулярна маса яких 36 та 34кДА відповідно [101]. Сумарний препарат ФГА має вуглеводну специфічність до олігосахаридів, окремі ізолектини, наприклад, лейкоаглютинін - до вуглеводів, що містять манозу, на відміну від еритроаглютиніну, що має вуглеводну специфічність до двоантенних глікопротеїнів, які містять залишки галактози [6].

Також показано, що лейкоаглютинін ФГА-Л, на відміну від еритроаглютиніну, здатен розпізнавати три – і тетраантенні β-1-6-N-ацетилглюкозамінні залишки N-гліканів, підвищення експресії яких на поверхні деяких злоякісних пухлин свідчить про метастазування та прогресію пухлини [7].

Протягом останніх років було виявлено що фітогемаглютинін має не лише мітогенну дію, а й цитотоксичні та проапоптичні властивості [102, 103, 104].

2.2.2. Хімічні агенти. 1) N - метил - N – нітро - N – нітрозогуанідин (МННГ або нітрозогуанідин) простий метилювальний агент, синтезований в Інституті молекулярної біології та генетики НАН України, та люб'язно наданий для досліджень к.б.н., с.н.с А.Г. Терентьєвим, використовувався як позитивний контроль апоптозу у вивченні впливу лектинів на зміни вмісту активованих каспаз та білка Вах у концентрації 0,5 мкг/мл.

2) мітоміцин С (ММС) (Sigma, США) – антибіотик протипухлинної дії, використовується у якості цитостатика, викликає зшивки ДНК та білка. У представлених дослідженнях ММС використовувався як позитивний контроль при вивченні впливу лектинів на проліферацію та апоптоз культур клітин ссавців. Для обробки клітин цей хімічний агент використовували у концентрації 10 - 0,1 мкг/мл залежно від типу культури клітин.

2.2.3 Обладнання. При виконанні цієї роботи використано прилади і обладнання таких марок та виробників: термостат ТС-80 (Україна), центрифуги К-23, К-24, К-70 “Janetsky” (НДР) та Spinko L-5, J-2-21 “Beckman” (Австрія), Eppendorf 5804, Eppendorf 5417R, спектрофотометри Specord та Specoll-11 “Carl Zeis” (НДР), “Titerteck” (Велика Британія), термостат з водяною сорочкою, CO₂ інкубатор IGO-150 “Cell Life”, Jouan (Франція), мікроскоп МЛ-2 (Росія), рН-метр ЕВ-74 (Білорусія), ваги ВТ-500 та ВЛТК-500 (Україна), автоматичні піпетки та дозатори “Labsystems” (Фінляндія), “Gilson” (Франція), камера для горизонтального електрофорезу multiSUB Choice “Cleaver Scientific Ltd” (США), прилад для напівсухого перенесення CSL Semi Dry Mini System “Cleaver Scientific Ltd” (США), джерело струму Stuart Scientific SI50, ампліфікатор iCycler single-color real-time PCR detection system (IQ5, BioRad, США), Molecular Imager Chemi Doc XRS+ Image Lab (Bio-Rad, США), качалка Stuart (Латвія), денситометр Anthos 2001 (США), морозильники “Мінськ 118” (Білорусія), холодильники “Мінськ 121” (Білорусія), “Норд” (Україна).

2.3 Дослідження впливу сумарного препарату ФГА та його ізолектинів на проліферацію культур клітин в умовах *in vitro*

При вивченні впливу білків на проліферацію клітин ссавців в умовах *in vitro*, використовували одну з модифікацій методу мікрокультур [105]. Усі дослідження проводились із використанням клітин китайського хом'ячка B11d-ii-FAF28C1237, клітин раку карциноми людини Нер-2 та клітин непухлинного походження людини 4BL. Клітини висівали у 96 лунковий планшет (по 3-5 тисяч клітин на кожен лунку) та інкубували у мінімальному середовищі Ігла (MEM) з додаванням 5 % ембріональної сироватки великої рогатої худоби (або новонароджених телят). Через 24 години клітини обробляли досліджуваними розчинами лектинів у діапазоні концентрацій від 0,01 до 1000 мкг/мл, що відповідає молярним концентраціям білків які наведено у табл. 2.1. Далі у роботі усі концентрації досліджуваних білків наведено саме у мкг/мл, оскільки через складну молекулярну будову сумарного лектину ФГА розрахувати його молярність неможливо.

Таблиця 2.1.

Перерахунок концентрації лектинів

Лектин	Молекулярна маса, кДа	концентрація, мМ	Концентрація, мкг/мл					
			0.01	0.1	1	10	100	1000
ФГА-Л	32		3.13* 10 ⁻⁷	3.13* 10 ⁻⁶	3.13* 10 ⁻⁵	3.13* 10 ⁻⁴	3.13* 10 ⁻³	3.13* 10 ⁻²
ФГА-Е	34		2.94* 10 ⁻⁷	2.94* 10 ⁻⁶	2.94* 10 ⁻⁵	2.94* 10 ⁻⁴	2.94* 10 ⁻³	2.94* 10 ⁻²
ФГА	невідома		-	-	-	-	-	-

Перед та після обробки клітини відмивали розчином PBS (рН 7,2-7,4, 50 мМ натрію фосфат та 150 мМ натрію хлорид) двічі. Обробка клітин білками тривала 4 години, у контрольному варіанті клітини перебували у середовищі MEM без додавання сироватки. У варіанті з мітоміцином С клітини перебували під впливом агента 1 год, у середовищі без сироватки. Мітоміцин С (ММС) використовували у концентрації 10 мкг/мл.

Після обробки клітини інкубували у середовищі MEM з додаванням 10% ембріональної сироватки великої рогатої худоби у стандартних умовах протягом 24 годин. Після чого клітини фіксували холодним розчином 50 % три-хлороцтової кислоти (ТХО) при температурі 4⁰С протягом 1 години. Фіксатор швидко відмивали дистильованою водою чотири рази та висушували планшет на повітрі. Зафіксований таким чином планшет фарбували 1 % розчином бромфенолового синього (50 мкл/лунку) протягом 20 хвилин при кімнатній температурі. Від фарбника клітини відмивали 1 % оцтовою кислотою 5 раз, та знову висушували планшет на повітрі. Потім у кожному лунку додавали по 100 мкл 10 мМ розчину трису (рН 7,2-7,4) та погойдували на орбітальному шейкері протягом 10 хвилин. Після чого вимірювали оптичну густину при довжині хвилі 620 нм, за зміною оптичної густини оцінювали темп проліферації клітин у дослідних та контрольних варіантах.

Дані вимірювань за допомогою програми "EXCEL" обраховували середнє значення для кожної з досліджуваних концентрацій та будували графік, що відображав вплив досліджуваних лектинів на проліферацію культури порівняно з контролем та дією мітоміцину С. Для статистичної обробки отриманих у цій серії дослідів результатів застосовували t-критерій Ст'юдента.

2.4 Кількісне визначення життєздатності клітин та обрахування апоптичного індексу

Здатність сумарного препарату ФГА та його ізолектинів індукувати апоптоз у культурі клітин ссавців вивчали із застосуванням методу прижиттєвого забарвлення клітин, описаного раніше [106]. Метод базується на здатності певних барвників проникати крізь біомембрану та диференційно забарвлювати внутрішньоклітинні компартменти. В роботі було застосовано акридиновий помаранчовий, який відноситься до групи вітальних барвників та застосовується для забарвлення живих клітин без порушення функцій останніх (забарвлює як ядра живих клітин, так і тих, що знаходяться у апоптозі). Також було використано етидіум бромід, який є флюоресцентним барвником, і здатний забарвлювати вміст ядра, зокрема нуклеїнові кислоти, у яскраво червоно-помаранчевий колір [107]. Застосування етидіум броміду дозволяє диференціювати живі та мертві клітини завдяки ефекту пермеабілізації їхньої мембрани, т. б. зміни її проникності до цього барвника залежно від статусу клітини. Поєднання вище описаних барвників дозволило нам диференціювати у культурі клітин живі, мертві та клітини у апоптозі, ядра яких забарвлювались відповідно у зелений, яскраво червоний та жовтий колір.

У цій серії експериментів клітини висівали на предметні скельця і культивували у стандартних умовах протягом 12 годин. Після чого обробляли розчинами лектинів у концентрації 100 мкг/мл та 1 мкг/мл. Перед та після обробки лектинами, клітини відмивали розчином PBS двічі. Обробка клітин білками тривала чотири години. Препарати аналізували під мікроскопом (ЛОМО, МЛ-2, Росія) зі збільшенням 90х, з комбінацією фільтрів, що підходять для збудження флюоресценції.

При проведенні аналізу враховували три типи клітин: живі клітини - з нормальним ядром, що мали яскраво-зелений хроматин з організованою структурою, клітини в стадії апоптозу - яскраво-зелений з жовтими

включеннями або жовтий хроматин, який сильно конденсований, чи фрагментований, мертві клітини - яскраво-червоний хроматин (рис 2.1.)

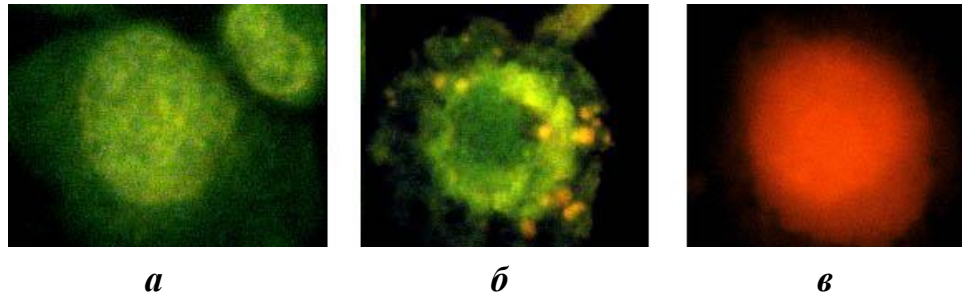


Рис. 2.1. Індукція апоптозу в культурі клітин раку гортані Нер-2: *а* - живі клітини (яскраво-зелений хроматин з організованою структурою); *б* - клітини у апоптозі (яскраво-зелений або жовтий хроматин, який сильно конденсований або фрагментований); *в* - мертві клітини (яскраво-помаранчевий хроматин). Клітини обробляли лейкоаглютиніном у концентрації 1 мкг/мл (збільшення 90х)

Апоптичний індекс (АІ) обраховували у процентах за формулою:

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

Для оцінки різниці показників використовували χ^2 .

2.5. Докінг аналіз можливої взаємодії ФГА-Л та рецепторів клітинної мембрани та характеристика енергетики такого зв'язування

Для біоінформатичного аналізу можливих взаємодій лектинів ФГА та рецепторів клітинної мембрани [108] залучених до контролю проліферації та апотозу застосували докінг аналіз. Експериментально визначені просторові структури лейкоаглютиніну та рецепторів отримали з бази даних Protein Data Bank (<http://www.rcsb.org>).

Одержані структури оптимізували у водному оточенні методом молекулярної динаміки (комп'ютерного моделювання руху атомів і молекул) із застосуванням програми NAMD [109]. Розрахунок молекулярної динаміки здійснювали за стандартних умов у NVE-ансамблі при температурі 37 °C з використанням силових полів Charmm35 протягом 10 нс [110].

Теоретичні розрахунки взаємодії лейкоаглютиніну з рецепторами виконували за допомогою програми ArgusLab4.01 [111]. Всі інші параметри не відрізнялися від описаних вище. З метою аналізу даних, одержаних під час обрахунку симуляції молекулярної динаміки, використовували два методи обрахунку середньоквадратичного відхилення: власне сам RMSD (Root Mean Square Deviation) – середньоквадратична зміна положення C α атомів відносно початкового стану та RMSD-швидкість (RMSD-velocity) – середньоквадратична зміна положення C α атомів кожної наступної ітерації відносно попередньої. У цьому випадку математичний термін «ітерація» (результат багаторазового повторення якоїсь математичної операції) характеризує один акт зміни положення атомів в ході обрахунку молекулярної динаміки та в перерахунку на одиницю часу дорівнює 0,002 нс.

Оцінку загальної взаємодії лектину та рецепторів проводили за допомогою програми ArgusLab.

Загальну енергію обчислювали, як суму енергії зв'язків, кутів між зв'язками, дигедральних кутів, неправильних торсійних кутів та ван-дер-ваальсових взаємодій, використовуючи силове поле UFF (яке дозволяє

оцінювати комплекси з хімічними лігандами невідомої топології). Позитивне значення величин можна пояснити тим, що не враховувався внесок електростатичних взаємодій, які мають від'ємне значення та значно переважають всі інші складові загальної енергії. Для оцінки якості просторової геометрії структур проводили аналіз кутів ϕ/ψ згідно з картою Рамачандрана [112].

Валідацію (процес, спрямований на підтвердження об'єктивними доказами того, що кінцевий продукт відповідає встановленим вимогам) тривимірних структур проводили, використовуючи веб-сервер http://www.psvs-1_3.nesg.org за допомогою програм ProCheck, Verify3D, ProsaII та MolProbity.

Якість просторової геометрії структур для кожної програми валідації представлено у двох варіантах: Raw score та Z-score. Загалом Raw score показує середню якість геометрії амінокислотних залишків молекули протеїну, в той час як Z-score – розподіл цих значень відносно середньоарифметичного. Чим більше значення Raw score та Z-score, тим краща якість.

Пошук стереохімічно неможливих контактів ($\leq 0,22$ нм), тобто помилкових зв'язків між амінокислотними залишками, та обчислення середньоквадратичного відхилення від ідеальної геометрії для амінокислотних залишків було проведено за допомогою програми PDB Validation (<http://deposit.rcsb.org/validate/>).

2.6. Дослідження впливу лектинів на зміни рівня експресії білків - медіаторів апоптозу

Дослідження впливу лектинів на зміни вмісту ефекторної каспази-3 (розщепленої форми), ефекторної каспази-8 а також проапоптичного білка Вах проводили із застосуванням Вестерн-блот аналізу [113]. Серію дослідів

проводили з використанням ракової лінії культури людини Her2 та лінії клітин непухлинного походження 4BL.

Клітини культивувались у стандартних умовах, при досягненні 70-80 % моношару клітини двічі відмивали розчином PBS (рН 7,2-7,4, 50 мМ натрію фосфат, 150 мМ натрію хлорид) від залишків сироватки та обробляли лектинами у концентраціях 1 мкг/мл. Обробку досліджуваними агентами проводили у безсироватковому середовищі протягом 4 годин. У негативному контролі клітини перебували 4 години у стандартному культуральному середовищі без додавання сироватки.

Як позитивний контроль апоптозу використовували МННГ у концентрації 5мкг/мл. Після чого клітини двічі відмивались від залишків досліджуваних речовин та знімалися для подальшого аналізу.

Клітинні екстракти виділяли згідно стандартної методики [114]. Клітини знімали механічно, за допомогою шпателью, та переносили у епендорф. Після цього проводили ультрацентрифугування клітин при 500 об/хв протягом 10 хвилин.

Після закінчення осадження клітин надосадову рідину зливали а осад промивали розчином PBS. Потім знову центрифугували при 500 об/хв протягом 10 хв. Осад гомогенізували у RIPA буфері (20 мМ трис-НСl, рН 7,5; 150 мМ NaCl; 1 мМ ЕДТА; 1 % NP-40; 1 % дезоксихолат натрію; 0,1 % додецилсульфат натрію) із додаванням 0,1 % розчину суміші інгібіторів протеаз (Sigma, США). Гомогенат центрифугували (10000 g, 20 хв), надосад використовували як сумарний лізат.

2.6.1. Визначення концентрації білка за методом Бредфорда.

Визначення концентрації сумарного білка у клітинних екстрактах проводили згідно з методикою, описаною раніше [115], з деякими модифікаціями. Реактив для визначення концентрації готували таким чином: 100 мг барвника кумасі G-250 розчиняли в 50 мл 96 % етанолу, додавали 100 мл 85 розчину фосфорної кислоти (вага/об'єм) та об'єм

отриманого розчину доводили до 1 л (кінцева концентрація кумасі G-250 складала 0,01 %, етанолу – 4,7 %, ортофосфатної кислоти – 8,5 %).

Вимірювання кількості білка проводили спектрофотометричним методом при довжині хвилі 595 нм. Калібрувальну криву будували, використовуючи як стандарт розчин альбуміну сироватки бика (БСА). Брали 0,1 мл розчину білка, додавали 1 мл реактиву та ретельно перемішували. Через 2 хв. визначали поглинання суміші при довжині хвилі 595 нм проти 1 мл розчину Бредфорда і 0,1 мл буфера, у якому був розчинений білок. Будували графік залежності поглинання A_{595} від концентрації стандарту. Концентрацію білка визначали по калібрувальній кривій. Спектрофотометричні вимірювання при визначенні концентрацій проводили на спектрофотометрі Specoll 11.

2.6.2. Електрофоретичне розділення білків у ПААГ. Електрофорез отриманих білкових препаратів проводили у 12 % ПААГ в денатуруючих умовах за Леммлі [116].

До досліджуваних зразків додавали 1/4 об'єму буфера для зразків (500 мМ трис-НС1, рН 6,8; 2 % додецилсульфату натрію; 5 % 2-меркаптоетанолу; 0,1 % бромфенолового синього). Зразки прогрівали (5 хв, 95⁰С) і наносили на гель.

Після електрофорезу гелі фарбували 0,2% Coomassie brilliant R-250 в суміші 45% етанол та 10% оцтова кислота упродовж ночі при кімнатній температурі, або 30–60 хв при температурі 90⁰С. Надлишок фарби відмивали буфером, що містив 10 % оцтової кислоти та 5% етанолу при перемішуванні до появи чітких білкових зон.

2.6.3. Вестерн-блот аналіз (імуноблотинг). 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). Попередньо мембрану змочували метанолом протягом 15с, промивали дистильованою водою та заливали буфером для переносу, що містив 200 мМ гліцину, 25

мМ трис-НСІ, рН 7,4 і 20 % метанолу. Після чого готували так званий «сендвіч» зі зволоженого у буфері для переносу фільтрувального паперу, мембрани та гелю з використанням буфера. Режим переносу становив 135 мА протягом 40 хв – 1 год.

Вестерн блот аналіз із застосуванням специфічних антитіл до досліджуваних білків проводили згідно інструкції фірми виробника.

Для попередження неспецифічного зв'язування нітроцелюлозні мембрани обробляли 4 % розчином сухого молока, приготованого в однократному буфері PBST(50 мМ натрію фосфат, 150 мМ натрію хлорид, 10% Tween 20), потім інкубували з первинними антитілами протягом ночі при кімнатній температурі. Розчин антитіл готували у 4 % сухого молока. Після цього мембрани відмивали 4 рази по 10 хвилин у однократному буфері PBST та обробляли вторинними антитілами у розведенні згідно рекомендацій виробника протягом години. Після чотирьохразової відмивки, мембрани вимочували впродовж 1–2 хв в ECL реagentі (1,25 мМ люмінол, 0,45 мМ кумарова кислота, 0,015 % H_2O_2 в 100 мМ трис–НСІ, рН 8,5). Після чого проводили візуалізацію та обрахунок результатів Вестерн блот аналізу 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.

Були використані антитіла: anti-Cleaved caspase-3 (p11 (h 176)-R: sc-22171, Santa Cruz Biotechnology), anti-BAX (HPA027878, Sigma), Cleaved caspase-8 p18 (H134): Sc- 7890 (Santa Cruz Biotechnology, США), anti-glyceraldehyde phosphate dehydrogenase (GAPDH) antibodies (G8795, Sigma, USA).

2.7. Аналіз змін рівня експресії про- та анти-апоптичних генів у культурах клітин ссавців під дією сумарного препарату ФГА та його ізолектинів

Для аналізу змін рівня експресії генів *Bax* і *Bcl-2* застосовували схему обробки культур клітин Hep-2 та 4BL, що наведена у п. 2.6. розділу «Матеріали та Методи». Із оброблених клітин виділяли сумарну РНК за допомогою UltraClean[®] Tissue&CellsRNAIsolationKit (MOBIO) згідно рекомендацій виробника. Отриману РНК обробляли ДНКазою I та використовували для синтезу комплементарної ДНК (кДНК). Концентрацію тотальної РНК вимірювали спектрофотометрично за показником поглинання при довжині хвилі $\lambda=260$ нм. Паралельно оцінювали наявність білкових домішок у зразках за показником поглинання при довжині хвилі $\lambda=280$ нм. Вимірювання та обрахунків проводили за допомогою прилада Нано Дроп 2000 (Thermo Scientific, США).

Для позбавлення від можливих домішок геномної ДНК у зразках тотальної РНК проводили їхню обробку ДНКазою I (вільною від РНКаз) згідно інструкції фірми виробника (Fermentas, Литва).

Синтез кДНК проводили на матриці сумарної РНК. Використовували M-MuLV ревертазу (20 од/мкл) та Oligo9(dT)₁₈ праймер (0,5 мкг/мл). Реакцію синтезу проводили згідно з протоколами до набору реагентів First Strand cDNA Synthesis Kit (ThermoScientific). Реакційна суміш (20 мкл) містила 10 мкг сумарної клітинної РНК Oligo9(dT)₁₈ праймер – 0,025 мкг/мл, десятикратний реакційний буфер, інгібітор РНКаз – 1 од/мкл та M-MuLV ревертазу – 2 од/мкл. Отриману кДНК використовували як матрицю для полімеразної ланцюгової реакції у реальному часі.

Рівень експресії генів – медіаторів апоптозу вивчали із використанням ПЛР у реальному часі. Використовували суміші Maxima SYBR Green/Fluorescein qPCR MasterMix (ThermoScientific) на приладі iCycler single-color real-time PCR detection system (IQ5, BioRad). 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 $2^{-\Delta C_T}$.

Реакцію ПЛР в реальному часі проводили із використанням пар праймерів, що наведено у таблиці 2.2. Після проведення реакції ПЛР у реальному часі зразки на наявність неспецифічних ПЛР продуктів перевіряли за допомогою методу електрофорезу у 2 % агарозному гелі.

Таблиця 2.2.

Праймери, що використовувалися в роботі

Ген	Праймери	Послідовність	Розмір фрагменту, пн
Вах	Прямий	5'-GGGGATTTCTGACTTGAGG-3'	134
	Зворотній	5'-TTGGGCTGATTTGATTTCTG-3'	
Vcl-2	Прямий	5'-CGACTTCGCCGAGATGTCCA GCCAG-3'	389
	Зворотній	5'-ACTTGTGGCCCAGATA GGCACCCAG-3'	
β -актин	Прямий	5'-GACTTCGAGCAAGAGATGGC-3'	233
	Зворотній	5'-AGCACTGTGTTGGCGTACAG -3'	

2.8. Статистичний аналіз

Для статистичної обробки результатів дослідження також використовували пакет програм "STATISTICA 7.0" ("StatSoft, Ic." 2004, США). Для оцінки різниці окремих показників, а також для виявлення

різниці між очікуваними та експериментально встановленими ефектами дії досліджуваних чинників використовували t-критерій Ст'юдента. Значення $p \leq 0,05$ розглядали як критерій значущості різниці.

Різниця в розподілі частот апоптичних клітин в контрольних та експериментальних групах аналізувалася за допомогою методу χ^2 .

РОЗДІЛ 3

ДОСЛІДЖЕННЯ ВПЛИВУ СУМАРНОГО ПРЕПАРАТУ ЛЕКТИНУ ФГА ТА ЙОГО ОКРЕМИХ ІЗОЛЕКТИНІВ НА ПРОЛІФЕРАЦІЮ ТА АПОПТОЗ КЛІТИН ССАВЦІВ

Відомо, що вуглевод-білкові взаємодії лежать в основі багатьох біологічних процесів, і саме тому лектини, які здатні вибірково зворотно зв'язувати вуглеводи та вуглеводні детермінанти на поверхні клітини, широко використовують для вирішення цілої низки фармакологічних, біотехнологічних, гістологічних та інших медико-біологічних завдань. Широке практичне застосування лектинів спонукає і розвиток фундаментальних досліджень у цій галузі. А накопичені останнім часом дані, про здатність лектинів різних груп впливати і на процеси апоптозу та індукувати, як рецептор-залежний, так і мітохондріальний шляхи клітинної загибелі (детально у Розділі 1), спонукають нас по-новому поглянути на вже, здавалось би, відомі і досліджені білки цієї групи.

Одним із таких білків є добре відомий мітоген – фітогемаглютинін. Цей лектин активно використовується для реакції бласттрансформації лейкоцитів при цитогенетичних дослідженнях. Однак, нещодавно було встановлено, що лейкоцитарний ізолектин - ФГА-Л, на відміну від еритроаглютиніну, здатен розпізнавати три – і тетраантенні β -1-6-N-ацетилглюкозамінні залишки N-гліканів, підвищення експресії яких на поверхні деяких злоякісних пухлин свідчить про метастазування та прогресію пухлини [7]. Було зроблено припущення, що наявність такої вуглеводної специфічності робить ФГА досить перспективним інструментом у галузі онкобіології. Тому було вирішено проаналізувати більш детально вплив цього лектину на проліферацію та виживання клітин ссавців в умовах *in vitro*.

3.1. Дослідження впливу лектинів ФГА на проліферацію та виживання клітин у культурах в умовах *in vitro*

Раніше у нашому відділі було показано здатність деяких не токсичних лектинів рослинного та тваринного походження дозозалежно впливати на проліферацію клітин ссавців та індукувати в них проапоптичні процеси [5]. І хоча для деяких лектинів описано лектиноасоційовані ензиматичні активності [117], завдяки яким вони здатні безпосередньо взаємодіяти з макромолекулами у клітині, більшість з цих білків все ж таки реалізує свою активність опосередковано, через взаємодію з рецепторами на поверхні клітинної мембрани. Було зроблено припущення, що вуглеводна специфічність лектину та його молекулярна будова, ймовірно, і є вирішальними для зв'язування із клітиною та реалізації мітогенної дії цієї групи білків. Як вже було зазначено вище, лектин ФГА відомий досить давно і вже знайшов широке застосування на практиці, однак вплив цього білка та його окремих ізолектинів на проліферацію соматичних клітин ссавців не достатньо вивчений.

Тож завданням першого етапу роботи було з'ясувати вплив лектинів квасолі звичайної (*Phaseolus vulgaris*), сумарного препарату ФГА та його окремих ізолектинів, на проліферацію та виживання клітин ссавців в 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 гортани людини Нер-2 та лінію клітин людини 4BL, що було отримано з крові здорового донора у нашому відділі раніше [100], (детальний опис ліній подано у Розділі 2). 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. 3.1 - 3.3).

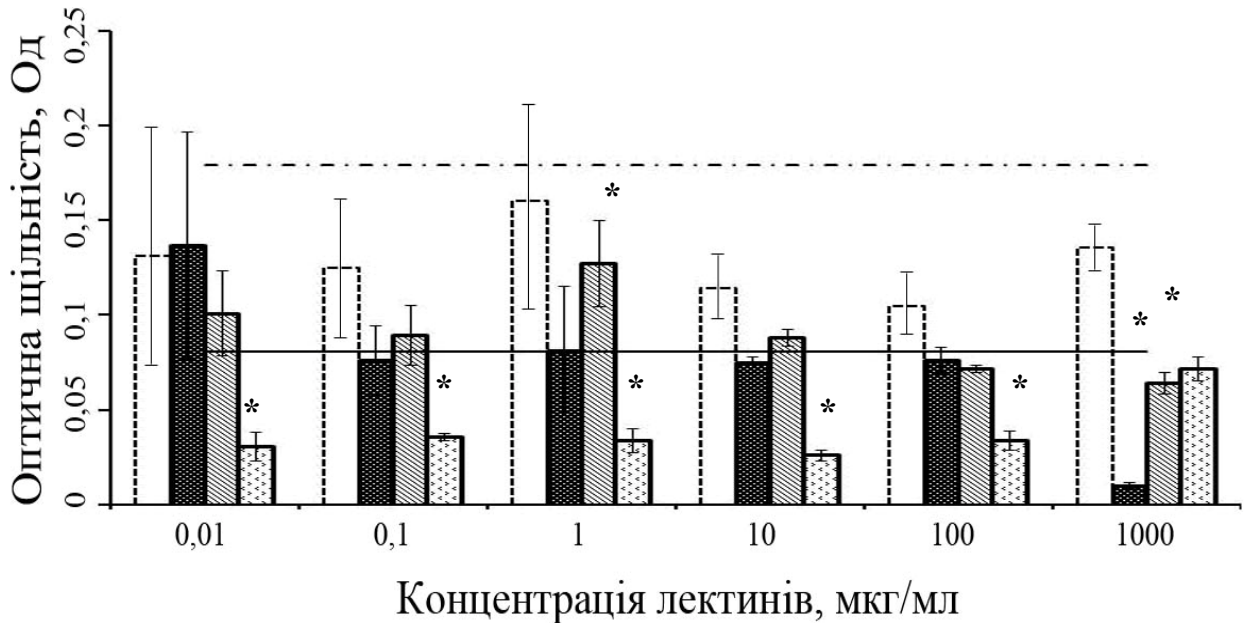


Рис. 3.1. Вплив сумарного препарату ФГА та його ізолектинів на проліферацію клітин раку гортані Нер-2; □ – ФГА-Л, ▨ – ФГА-Е, ■ – ФГА, ▤ – теоретично очікувана дія двох ізолектинів, - · - · - контроль, — — — — ММС; * - достовірна різниця у показниках щодо відповідного контролю ($p \leq 0,05$; $n=3$)

При дії білків у високих концентраціях (100-1000 мкг/мл) спостерігалось статистично достовірне зниження кількості клітин під дією сумарного препарату ФГА та його ізолектинів. У разі нижчих концентрацій препаратів ефект інгібуючої/цитостатичної дії білків послаблювався (рис. 3.1.), але в окремих випадках спостерігалась висока мітогенна активність (рис. 3.2, 3.3).

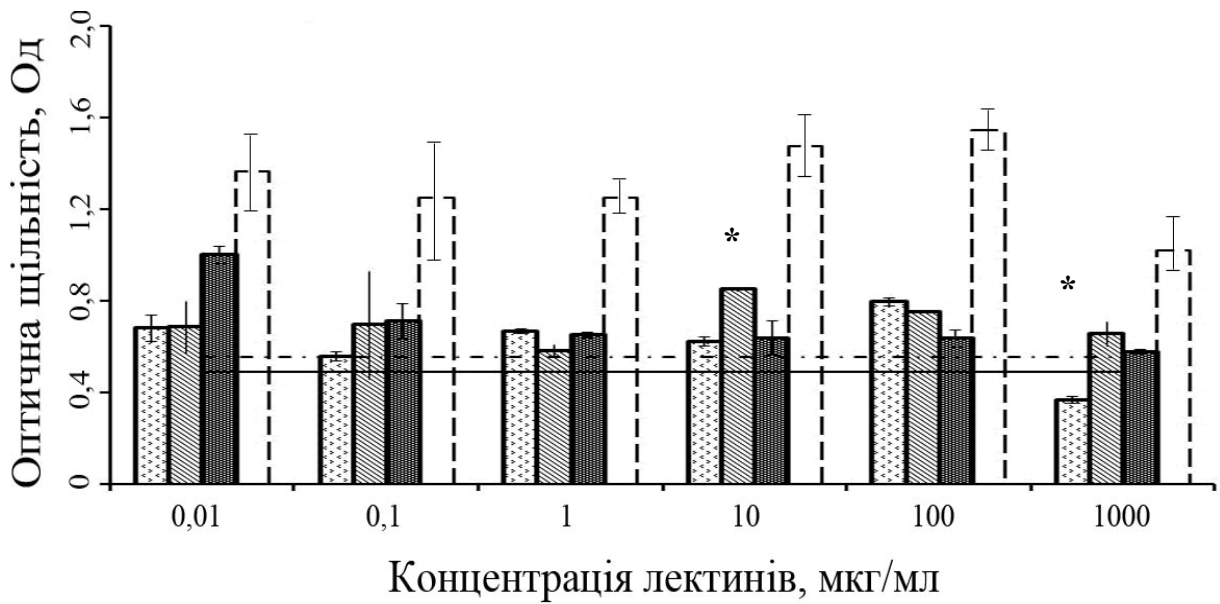


Рис. 3.2. Вплив сумарного препарату ФГА та його ізолектинів на проліферацію клітин китайського хом'ячка; [шпигунок] – ФГА-Л, [шпигунок] – ФГА-Е, [шпигунок] – ФГА, [дуже пунктир] – теоретично очікувана дія двох ізолектинів, [горизонтальна лінія] – контроль, [горизонтальна лінія] – ММС; * - достовірна різниця у показниках щодо відповідного контролю ($p \leq 0,05$; $n=3$)

Варто зауважити, що характер біологічної дії трьох препаратів відрізнявся залежно від обраної тест-системи. Так, у культурі ракових клітин Нер-2 (рис.3.1), досліджувані нами білки не виявляли мітогенної активності, на відміну від дослідів з використанням ліній китайського хом'ячка та умовно нормальних клітин 4BL (рис 3.2.та 3.3). Також відрізнялись ефекти дії окремих ізолектинів та сумарного препарату. Так, у культурах клітин людини ракового походження (рис. 3.1.) більш значно виражений цитостатичний/інгібуючий ефект дії мав лейкоаглютинін при дії у всіх досліджуваних концентраціях, а у культурі клітин не пухлинного походження 4BL (рис. 3.3) – еритроаглютинін та сумарний препарат ФГА, при дії лектинів у концентрації 100 та 1000мкг/мл. Можливо, такі відмінності

у біологічній активності сумарного препарату та його ізолектинів можна пояснити різною вуглеводною специфічністю білків та відмінностями глікокоду (різними вуглеводними детермінантами на поверхні клітин) між різними типами клітин.

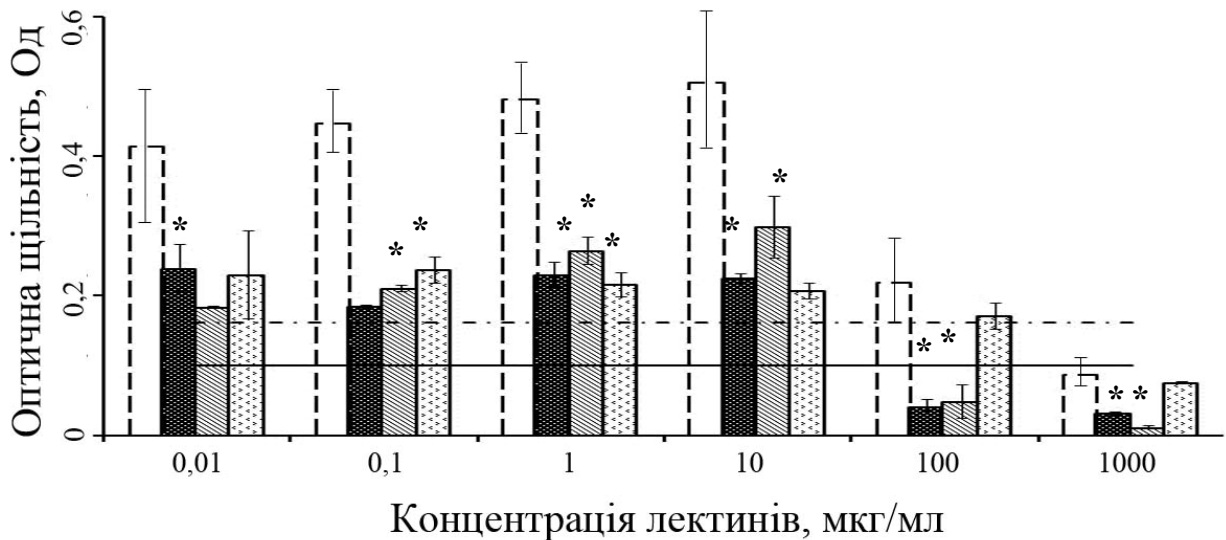


Рис. 3.3. Вплив сумарного препарату ФГА та його ізолектинів на проліферацію культури клітин 4BL; ▨ – ФГА-Л, ▩ – ФГА-Е, ■ – ФГА, --- – теоретично очікувана дія двох ізолектинів, — · — – контроль, — – ММС; * - достовірна різниця у показниках щодо відповідного контролю ($p \leq 0,05$; $n=3$)

Зважаючи на те, що і сумарний препарат, і окремі ізолектини ФГА по-різному впливали на проліферацію клітин ссавців у досліджуваному діапазоні концентрацій, ми висунули припущення, що вплив сумарного препарату ФГА на проліферацію клітин ссавців в умовах *in vitro* може бути результатом спільної дії його ізолектинів, лейкоаглютиніну та еритроаглютиніну, при цьому кінцевий ефект може зумовлюватися як сумарною, так і конкурентною дією цих білків. Порівняння експериментально отриманої та розрахованої нами кривої ефекту теоретично очікуваної дії сумарного препарату (рис. 3.1-3.3) за умов незалежної

адитивної дії обох його ізолектинів, свідчить на користь припущення про конкурентну взаємодію еритроаглютиніну та лейкоаглютиніну за умов експерименту. Дійсно можливо, що молекули двох ізолектинів ФГА конкурують за мішені – вуглеводні детермінанти на поверхні клітинної мембрани. Але таке припущення потребує подальших молекулярно-біологічних досліджень.

3.2. Кількісний аналіз життєздатності клітин. Аналіз морфологічних змін ядерного апарату клітин при апоптозі

Оскільки при дослідженні впливу ФГА та його ізолектинів на проліферацію клітин ссавців в умовах *in vitro* спостерігалось статистично достовірне зменшення кількості клітин після обробки лектинами у високих концентраціях, було зроблено припущення про здатність досліджуваних лектинів індукувати апоптоз за даних умов експерименту. Як відомо з літературних даних, деякі лектини дійсно здатні спричиняти апоптоз, опосередковано активуючи певні сигнально-регуляторні шляхи клітини [57]. Для перевірки нашого припущення ми провели серію дослідів з використанням досліджуваних препаратів у концентраціях 1 та 100 мкг/мл, кількісне визначення життєздатності клітин та апоптичного індексу проводилось відразу та через 12 год після обробки, згідно методики. Обробка лектинами тривала 4 години (Розділ 2).

В усіх дослідних варіантах спостерігали живі клітини з яскраво зеленим ядром (рис. 3.4, 3.5, 3.6 б та в), клітини у апоптозі – де спостерігали ядро із жовтими включеннями або повністю жовті ядра із початковими стадіями фрагментації (рис. 3.4, 3.5, 3.6 г - е) та мертві клітини з конденсованим яскраво помаранчевим, іноді навіть червоним ядром з фрагментацією (рис 3.4, 3.5, 3.6 є - з).

При дослідженні впливу сумарного препарату ФГА та ізолектинів на частоту апоптичних клітин в культурі при використанні лінії Нер-2 нами було показано, що обробка білками у концентрації 1мкг/мл зменшувала кількість живих клітин, порівняно з контролем (рис. 3.7.).

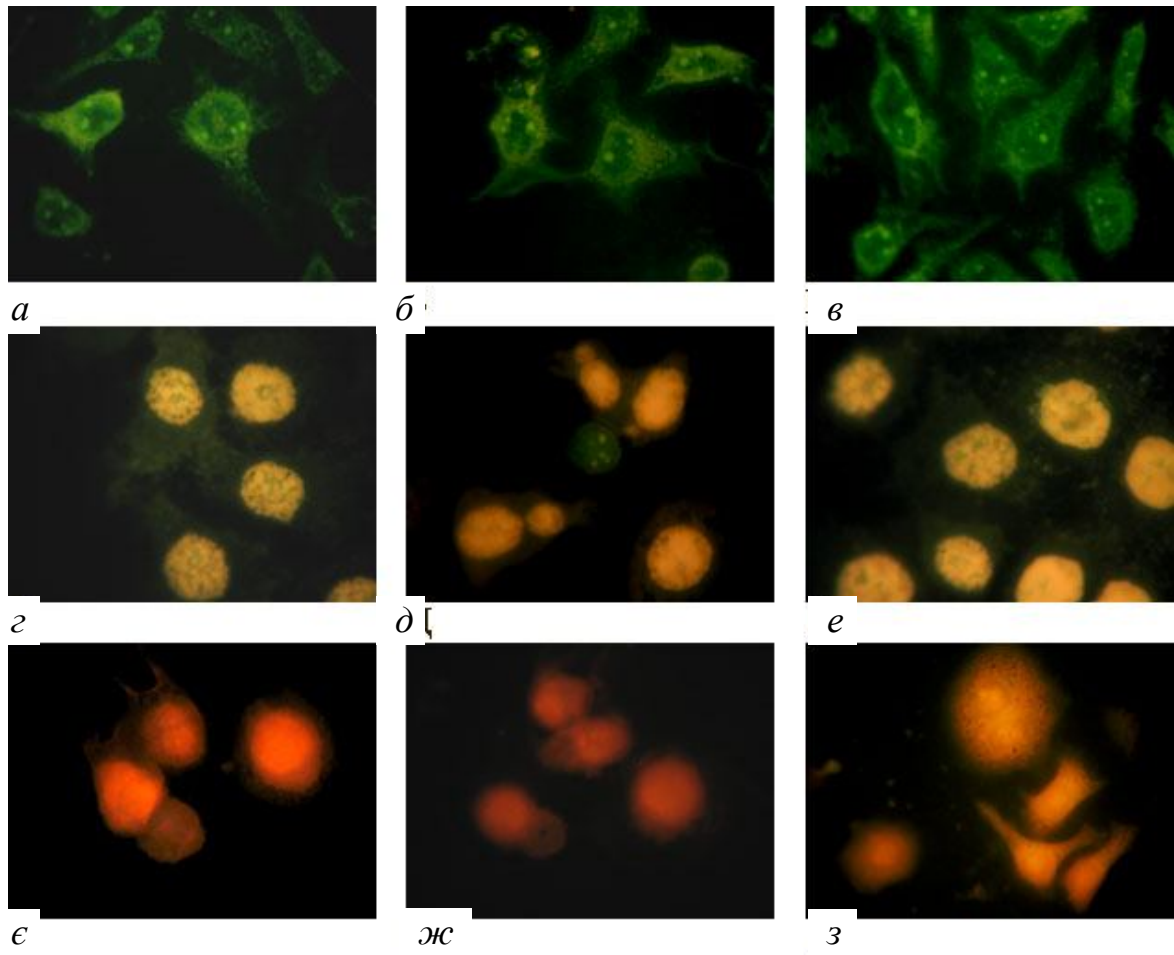


Рис 3.4. Індукція апоптозу у культурі клітин раку гортані Нер-2: *а, б, в* – живі клітини; *а* - клітин у контрольному варіанті без обробки лектинами; *г, д, е* - клітини у апоптозі (яскраво-зелений або жовтий хроматин, який сильно конденсований або фрагментований); *є, ж, з* - мертві клітини (жовтий та помаранчевий хроматин із фрагментацією ядра); *б, г* - одразу після обробки лейкоаглютиніном у концентрації 1 мкг/мл; *в, д* – через 12 годин після обробки лейкоаглютиніном у концентрації 1 мкг/мл; *е, є* - одразу після обробки еритроаглютиніном у концентрації 100 мкг/мл; *ж, з* - одразу після обробки лейкоаглютиніном у концентрації 100 мкг/мл; (збільшення 90х) |

Найвищу частоту апоптичних клітин спостерігали після дії еритроаглютиніну і вона становила приблизно - 80%. Менш активним індуктором підвищення частоти апоптичних клітин, у цій серії дослідів, виявився лейкоаглютинін, так клітин у апоптозі було після його впливу спостерігали лише 40 %.

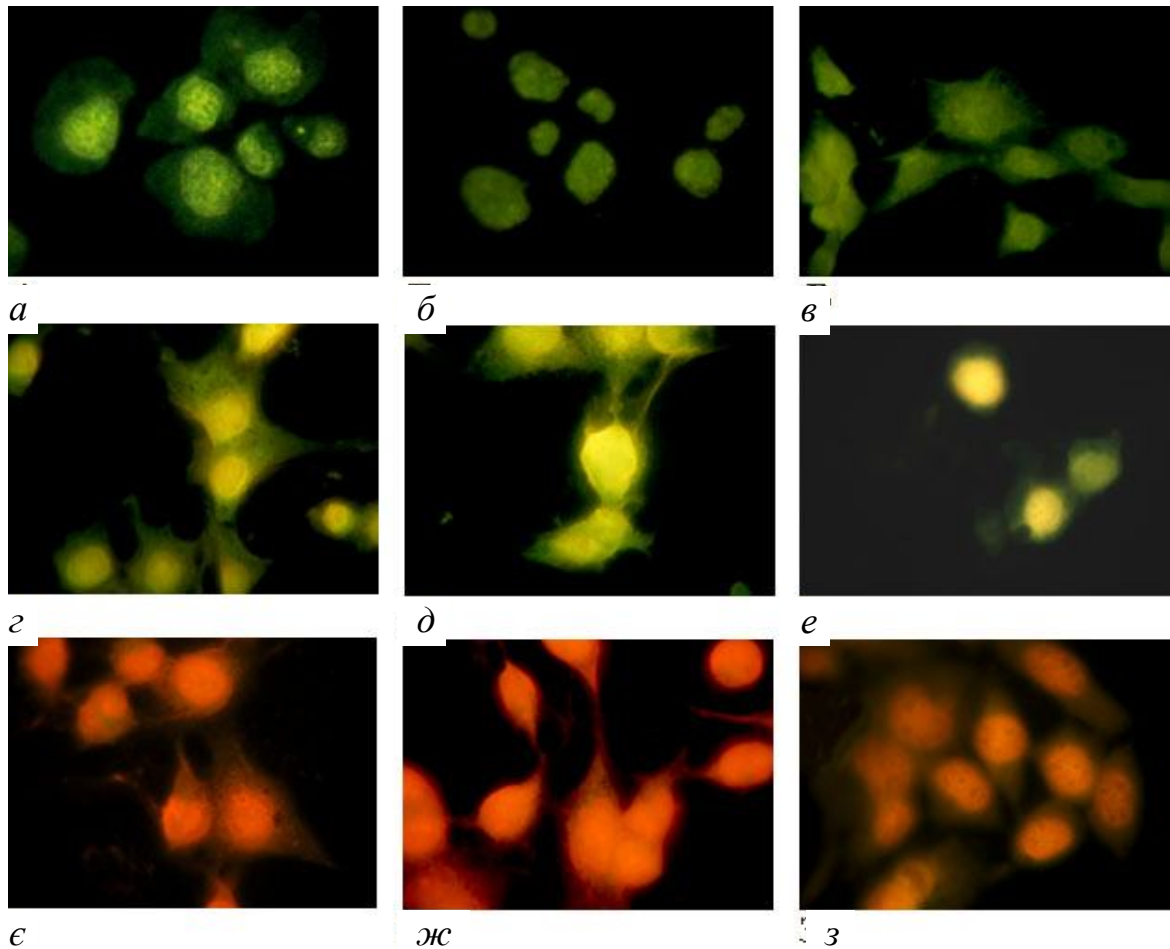


Рис 3.5 Індукція апоптозу у культурі клітин фібробластів китайського хом'ячка: *а, б, в* – живі клітини; *а* - клітин у контрольному варіанті без обробки лектинами; *г, д, е* - клітини у апоптозі (яскраво-зелений або жовтий хроматин, який сильно конденсований або фрагментований); *є, ж, з* - мертві клітини (жовтий та помаранчевий хроматин із фрагментацією ядра); *б, г* - одразу після обробки лейкоаглютиніном у концентрації 1 мкг/мл; *в, д* – через 12 годин після обробки лейкоаглютиніном у концентрації 1 мкг/мл; *е, є* - одразу після обробки еритроаглютиніном у концентрації 100 мкг/мл; *ж, з* - одразу після обробки лейкоаглютиніном у концентрації 100 мкг/мл; (збільшення 90х)

За рівнем проапоптичного ефекту сумарний препарат фітогемаглютиніну займав проміжне місце порівняно з дією окремих ізолектинів і становив приблизно 56%.

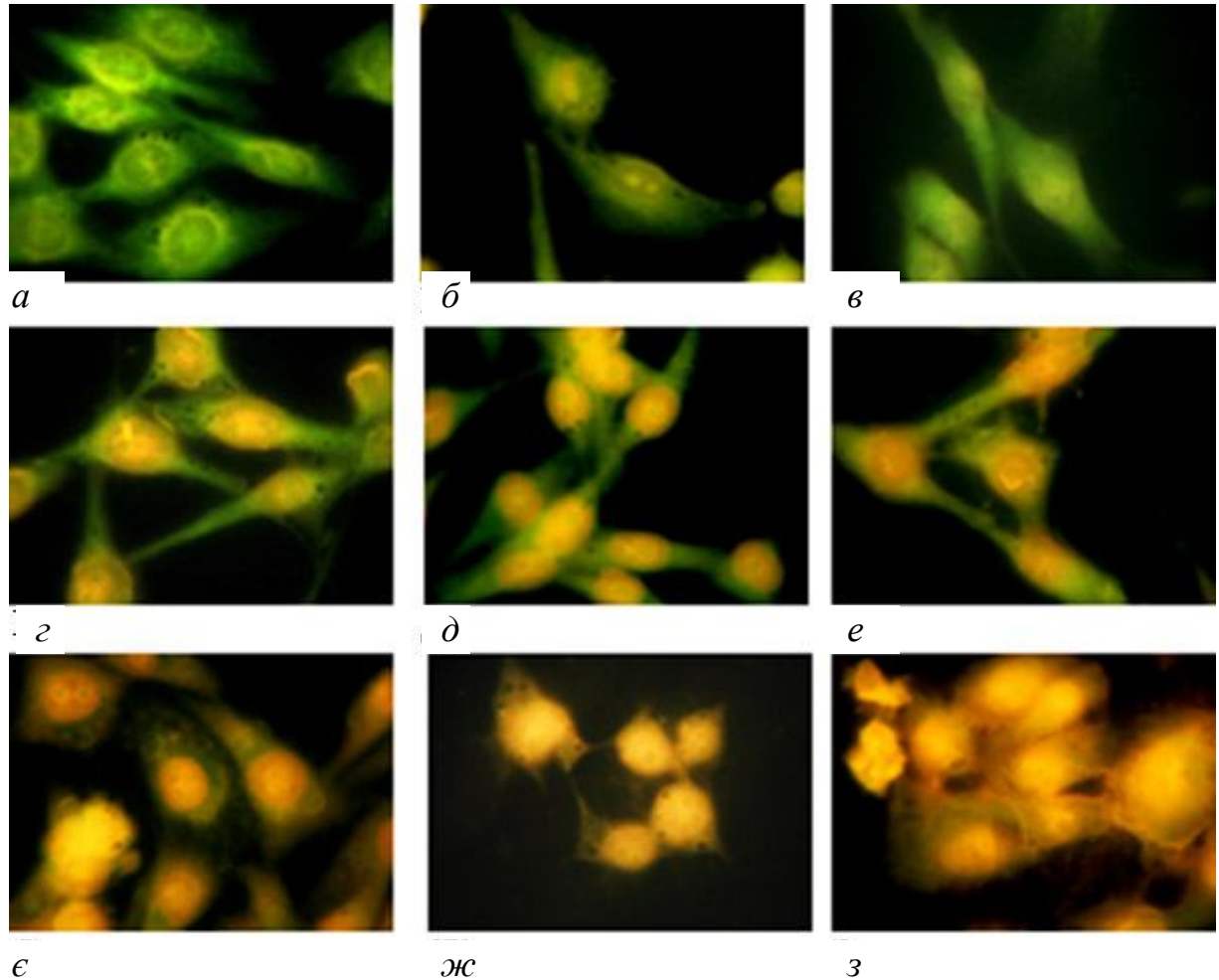
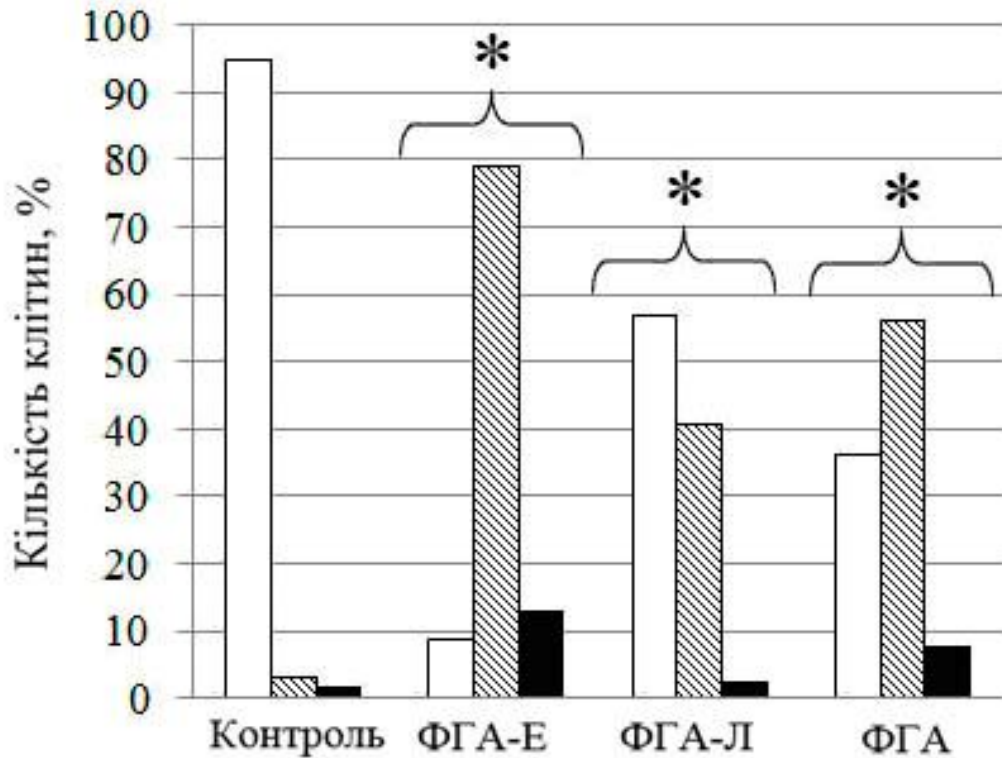


Рис 3.6. Індукція апоптозу у культурі клітин людини 4BL: *а, б, в* – живі клітини; *а* - клітин у контрольному варіанті без обробки лектинами; *г, д, е* - клітини на ранній стадії апоптозу (яскраво-зелений або жовтий хроматин, який сильно конденсований або фрагментований); *є, ж, з* - мертві клітини (жовтий та помаранчевий хроматин із фрагментацією ядра); *б, г* - одразу після обробки лейкоаглютиніном у концентрації 1 мкг/мл; *в, д* – через 12 годин після обробки лейкоаглютиніном у концентрації 1 мкг/мл; *е, є* - одразу після обробки еритроаглютиніном у концентрації 100 мкг/мл; *ж, з* - одразу після обробки лейкоаглютиніном у концентрації 100 мкг/мл; (збільшення 90х)

Аналізуючи частоту апоптичних клітин у культурі пухлинних клітин Нер-2 при обробці досліджуваними лектинами у концентрації 1мкг/мл через 12 год після обробки, з'ясували, що біологічна активність ізолектинів мала дещо інший характер, порівняно з попереднім дослідом (рис. 3.8).



□ – живі клітини; ▨ – клітини в апоптозі; ■ – мертві клітини

Рис. 3.7. Індукція апоптозу у культурі клітин Нер-2 сумарним препаратом ФГА та його ізолектинами. Концентрація досліджуваних лектинів становила 1 мкг/мл, врахування частоти апоптичних клітин проводили відразу після обробки. Розподіл частот живих та апоптичних клітин для усіх дослідних варіантів достовірно відрізнявся від контролю (* $p \leq 0,05$, $n=3$ за критерієм χ^2 , у кожному дослідному варіанті проаналізовано не менше 200 клітин)

Так, 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 дослідження, де найбільший відсоток апоптичних клітин спричиняла дія еритроаглютиніну (рис. 3.7).

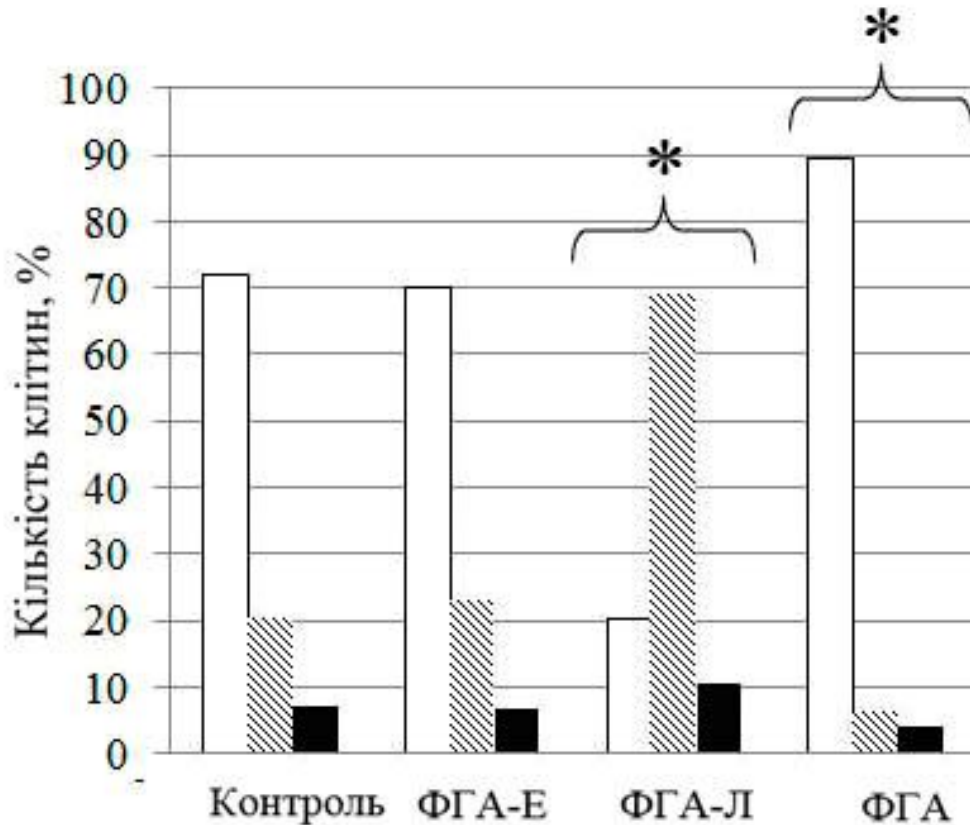


Рис. 3.8. Індукція апоптозу у культурі клітин Нер-2 сумарним препаратом ФГА та його ізолектинами. Концентрація досліджуваних лектинів становила 1 мкг/мл, підрахунок частоти апоптичних клітин проводили через 12 годин після обробки. Розподіл частот живих та апоптичних клітин для усіх дослідних варіантів достовірно відрізнявся від контролю (* $p \leq 0,05$, $n=3$ за критерієм χ^2 , у кожному дослідному варіанті проаналізовано не менше 200 клітин); □ – живі клітини; ▨ – клітини в апоптозі; ■ – мертві клітини

Вірогідно ($p \leq 0,05$) 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, де вивчали вплив ФГА та його ізолектинів на проліферацію клітин Нер-2 (рис. 3.1), у якому також досліджували дію лектинів через 12 год після обробки.

Було досліджено вплив сумарного препарату та його ізолектинів на частоту апоптичних клітин у концентрації 100 мкг/мл із використанням тієї ж тест-системи (рис. 3.9).

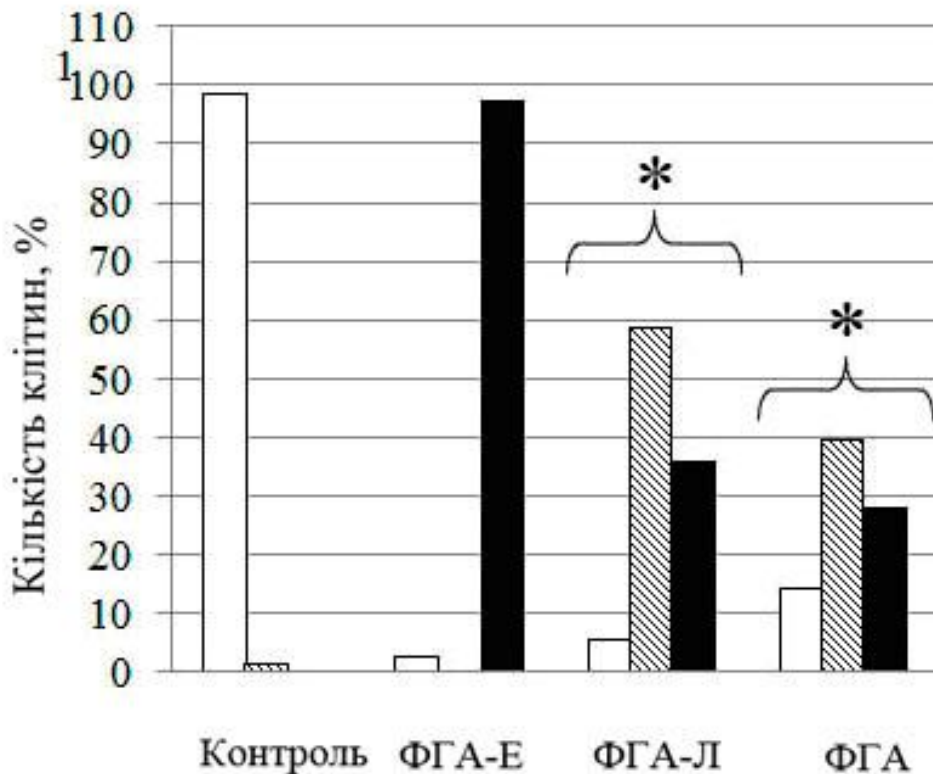


Рис. 3.9. Індукція апоптозу у культурі клітин Нер-2 сумарним препаратом ФГА та його ізолектинами. Концентрація досліджуваних лектинів становила 100 мкг/мл, врахування частоти апоптичних клітин проводили відразу після обробки. Розподіл частот живих та апоптичних клітин для усіх дослідних варіантів достовірно відрізнявся від контролю (* $p \leq 0,05$, $n=3$ за критерієм χ^2 , у кожному дослідному варіанті проаналізовано не менше 200 клітин); □ – живі клітини; ▨ – клітини в апоптозі; ■ – мертві клітини

Було показано, що обробка усіма досліджуваними лектинами статистично достовірно ($p \leq 0,05$) змінює розподіл 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 спостерігали найвищий відсоток мертвих клітин порівняно із варіантами обробленими лейкоаглютиніном та сумарним препаратом; рівень значимості цих відмінностей також становив $p \leq 0,05$ (рис.3.9).

Варто також зауважити, що на відміну від двох попередніх експериментів, в яких дію лектинів досліджували при низькій концентрації, у цьому дослідному варіанті спостерігали і тенденцію до зростання частоти мертвих клітин.

Таке спостереження свідчить на користь гіпотези про концентраційну залежність при реалізації біологічної дії досліджуваних препаратів та узгоджується із результатами досліджень впливу лектинів на проліферацію клітин в умовах *in vitro* (рис. 3.1).

При індукції апоптозу у культурі клітин китайського хом'ячка показано, що при концентрації 1 мкг/мл сумарний препарат та лейкоаглютинін статистично достовірно ($p \leq 0,05$) індукували підвищення частоти апоптичних клітин лише одразу після обробки (рис. 3.10).

Через 12 годин після обробки, розподіл частот також достовірно відрізнявся від контрольних показників ($p \leq 0,05$). Однак характер розподілу частот клітин був зовсім іншим (рис. 3.11).

У цьому варіанті ні сумарний препарат ФГА, ні окремі ізолектини не лише не спричиняли зростання частоти апоптичних клітин, а навпаки, такі клітини зустрічались рідше, ніж у контрольних варіантах.

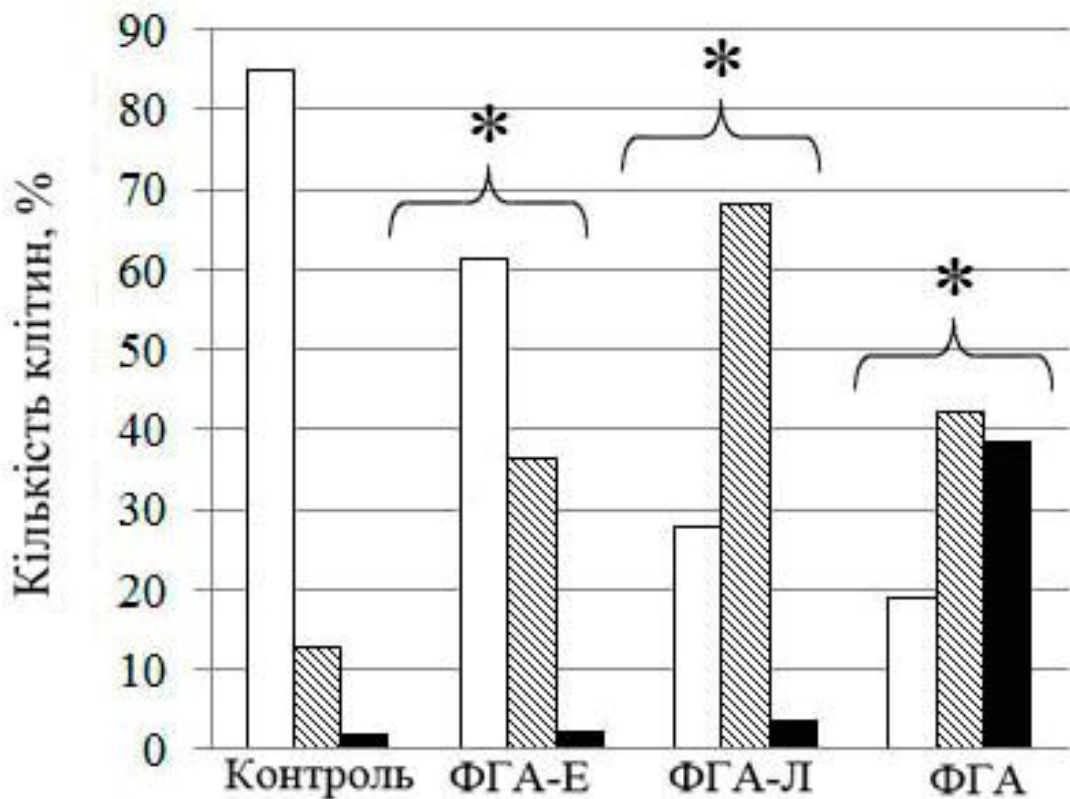


Рис. 3.10. Індукція апоптозу у культурі клітин китайського хом'ячка сумарним препаратом ФГА та його ізолектинами. Концентрація досліджуваних лектинів становила 1 мкг/мл, врахування частоти апоптичних клітин проводили одразу після обробки. Розподіл частот живих та апоптичних клітин для усіх дослідних варіантів достовірно відрізнявся від контролю (* $p \leq 0,05$, $n=3$ за критерієм χ^2 , у кожному дослідному варіанті проаналізовано не менше 200 клітин); \square – живі клітини; ▨ – клітини в апоптозі; \blacksquare – мертві клітини

Такі суттєві відмінності між двома експериментами можна пояснити або швидкою загибеллю та розпадом апоптичних клітин – або тим, що одразу після обробки лектинами не усі клітини, які перебувають у апоптозі гинуть, вочевидь більшість з них репарується та активно проліферує.

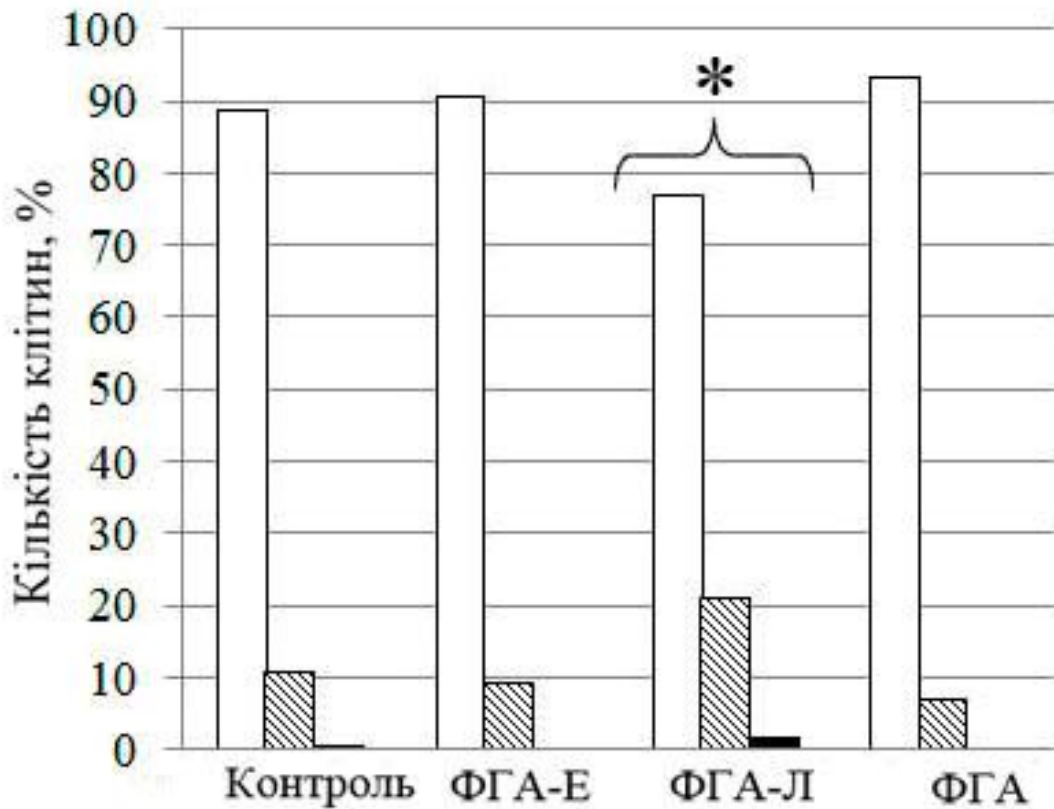


Рис. 3.11. Індукція апоптозу у культурі клітин китайського хом'ячка сумарним препаратом ФГА та його ізолектинами. Концентрація досліджуваних лектинів становила 1 мкг/мл, врахування частоти апоптичних клітин проводили через 12 годин після обробки. Розподіл частот живих та апоптичних клітин для усіх дослідних варіантів достовірно відрізнявся від контролю (* - $p \leq 0,05$ $n=3$ за критерієм χ^2 , у кожному дослідному варіанті проаналізовано не менше 200 клітин); □ – живі клітини; ▨ – клітини в апоптозі; ■ – мертві клітини

При дослідженні дії лектинів у концентрації 100 мкг/мл спостерігали статистично достовірне ($p \leq 0,05$) зниження частоти живих клітин порівняно з контролем (рис. 3.12). Найвищу частоту апоптичних клітин спостерігали при обробці сумарним препаратом ФГА. Також варто зауважити, що серед проаналізованих клітин переважали мертві клітини.

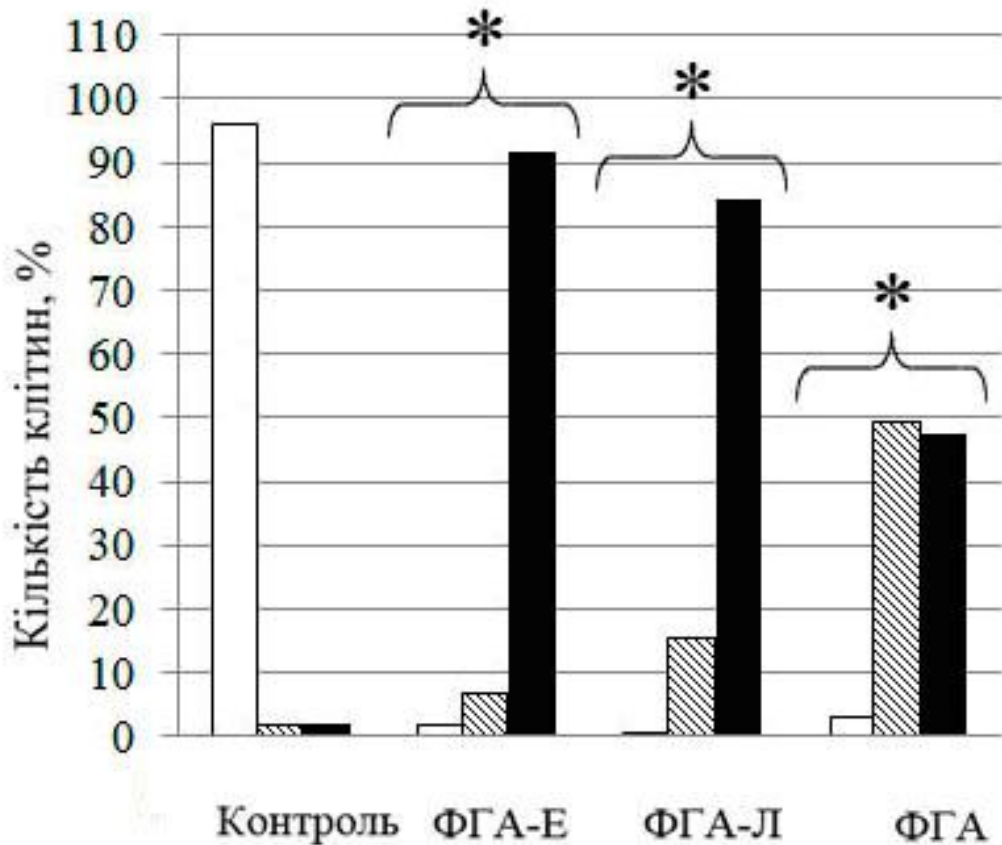


Рис. 3.12. Індукція апоптозу у культурі клітин китайського хом'ячка сумарним препаратом ФГА та його ізолектинами. Концентрація досліджуваних лектинів становила 100 мкг/мл, врахування частоти апоптичних клітин проводили відразу після обробки. Розподіл частот живих та апоптичних клітин для усіх дослідних варіантів достовірно відрізнявся від контролю (* - $p \leq 0,05$, $n=3$ за критерієм χ^2 , у кожному дослідному варіанті проаналізовано не менше 200 клітин); □ – живі клітини; ▨ – клітини в апоптозі; ■ – мертві клітини

Розподіл частот живих та апоптичних клітин відрізнявся від такого у препаратах, оброблених еритроаглютиніном та сумарним ФГА, на рівні значимості $p \leq 0,05$.

Із використанням культури клітин людини 4BL (рис. 3.13), у якості модельного об'єкту, було показано, що при концентрації 1 мкг/мл

еритроаглютинін змінював розподіл частот живих та апоптичних клітин (рівень значимості відмінностей становив $p \leq 0,05$).

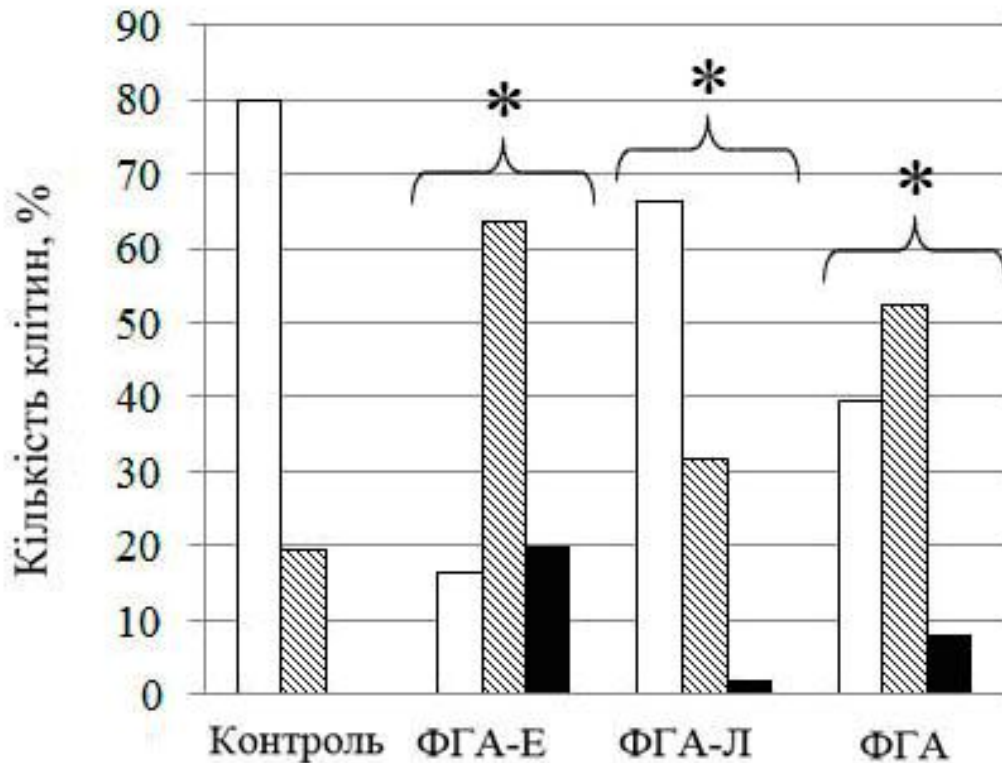


Рис. 3.13. Індукція апоптозу у культурі клітин 4BL сумарним препаратом ФГА та його ізолектинами. Концентрація досліджуваних лектинів становила 1 мкг/мл, врахування частоти апоптичних клітин проводили відразу після обробки. Розподіл частот живих та апоптичних клітин для усіх дослідних варіантів достовірно відрізнявся від контролю ($*p \leq 0,05$, $n=3$ за критерієм χ^2 , у кожному дослідному варіанті проаналізовано не менше 200 клітин); □— живі клітини; ▨— клітини в апоптозі; ■— мертві клітини

При цьому спостерігали зростання частоти апоптичних клітин як відразу, так і через 12 год після обробки (рис. 3.13 та 3.14). Обробка

сумарним препаратом ФГА у концентрації 1мкг/мг через 12 год спричиняла лише незначне зменшення кількості живих клітин у культурі, порівняно з контролем, а у клітинах, оброблених лейкоаглютиніном, частота живих клітин навіть дещо зростала (рівень значимості відмінностей розподілу частот становив $p \leq 0,05$).

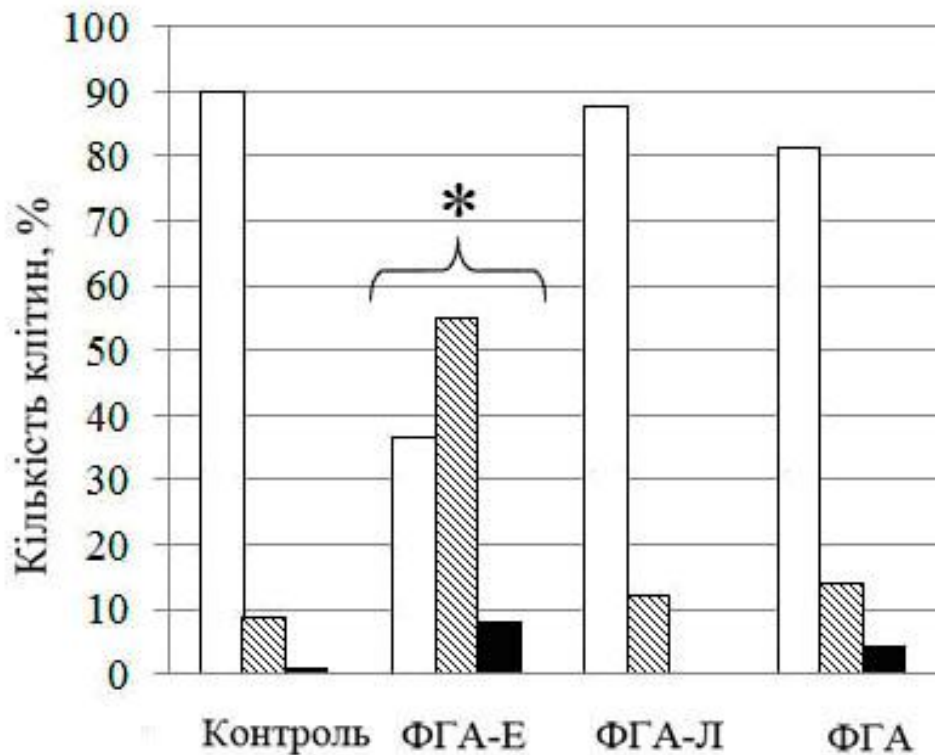


Рис. 3.14. Індукція апоптозу у культурі клітин 4BL сумарним препаратом ФГА та його ізолектинами. Концентрація досліджуваних лектинів становила 1 мкг/мл, врахування частоти апоптичних клітин проводили через 12 годин після обробки. Розподіл частот живих та апоптичних клітин для усіх дослідних варіантів достовірно відрізнявся від контролю (* $p \leq 0,05$ $n=3$ за критерієм χ^2 , у кожному дослідному варіанті проаналізовано не менше 200 клітин); \square – живі клітини; ▨ – клітини в апоптозі; \blacksquare – мертві клітини

При концентрації досліджуваних білків 100 мкг/мл (рис. 3.15), як і у попередніх дослідах, ми спостерігали статистично достовірну індукцію частоти апоптичних клітин усіма досліджуваними лектинами ($p \leq 0,05$). Цікаво, що вплив досліджуваних ізолектинів ФГА на клітини різного походження *in vitro* дещо різнився.

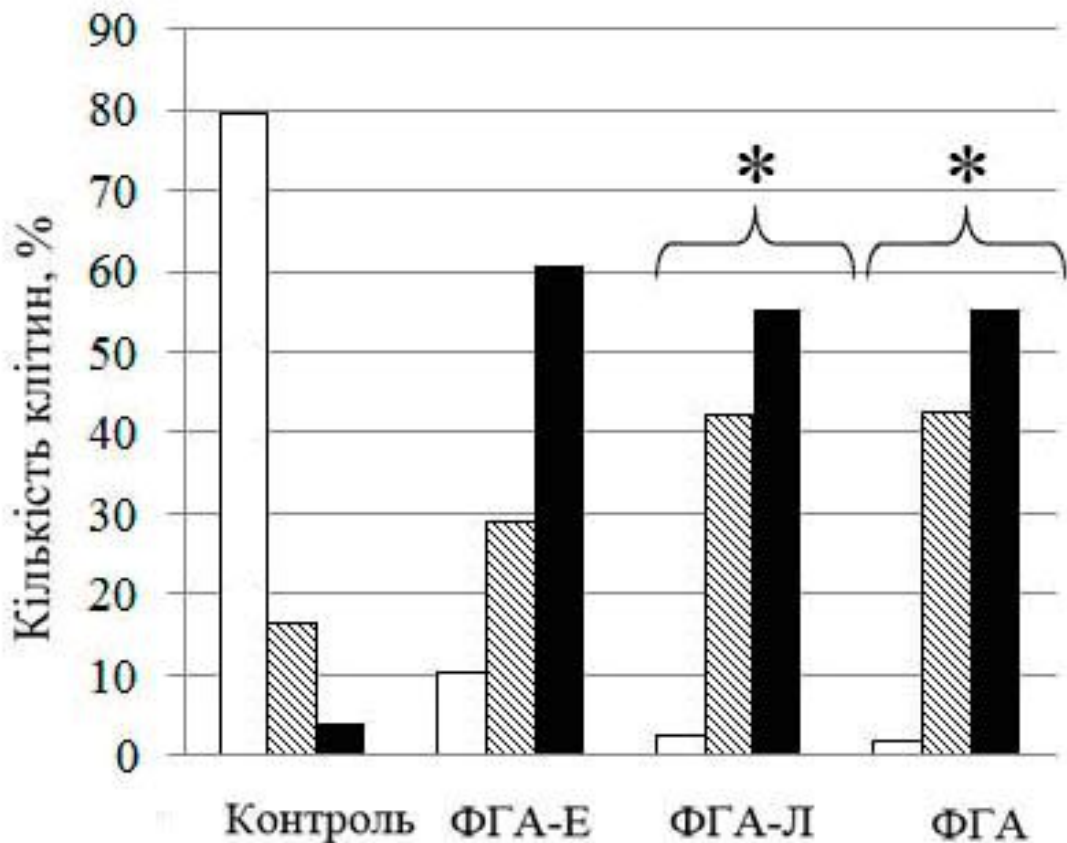


Рис. 3.15. Індукція апоптозу у культурі клітин 4BL сумарним препаратом ФГА та його ізолектинами. Концентрація досліджуваних лектинів становила 100 мкг/мл, врахування частоти апоптичних клітин проводили відразу після обробки. Розподіл частот живих та апоптичних клітин для усіх дослідних варіантів достовірно відрізнявся від контролю ($*p \leq 0,05$, $n=3$ за критерієм χ^2 , у кожному дослідному варіанті проаналізовано не менше 200 клітин); □ – живі клітини; ▨ – клітини в апоптозі; ■ – мертві клітини

Так, після обробки сумарним ФГА та лейкоаглютиніном в концентрації 1 мкг/мл у культурі клітин китайського хом'ячка (рис. 3.10), спостерігали достовірно вищий рівень апоптозу, ніж в культурі Нер-2 (рис. 3.7); в той же час після обробки ФГА-Е спостерігали цілком протилежну картину.

Достовірно різнився і вплив лектинів на культури 4BL та китайського хом'ячка після обробки еритроаглютиніном у концентрації 1 мкг/мл із подальшою постінкубацією (рис. 3.11 та 3.14). У клітинах китайського хом'ячка еритроаглютинін спричиняв зміну розподілу частот живих та апоптичних клітин у бік живих, – в той же час у культурі 4BL після такої обробки еритроаглютиніном спостерігалось, навпаки, відчутне зниження частоти живих клітин. Після обробки ж лейкоаглютиніном, навпаки, у культурі клітин не пухлинного походження 4BL спостерігали достовірне зростання частот живих клітин, а в культурі китайського хом'ячка – незначне її зниження.

Отримані дані свідчать про вплив досліджених лектинів на апоптоз у культурі клітин ссавців, а також їхній дозозалежний вплив на проліферацію. При низьких концентраціях спостерігали переважно, або мітогенну активність лектинів, або відсутність індукції апоптозу, окрім дії лейкоаглютиніну, у культурі клітин раку гортані Нер-2 (рис. 3.7). Цікаво також, що відсоток апоптичних клітин одразу після обробки білками 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.

При високих концентраціях лектини спричиняли зменшення кількості живих клітин та статистично достовірно підвищували відсоток апоптичних клітин, причому у цих дослідних варіантах переважно спостерігали мертві клітини, на відміну від дослідів, де препарати використовувались при низьких концентраціях.

Таким чином, в результаті проведеної роботи було показано, що сумарний препарат ФГА та його окремі ізолектини мають дозозалежний характер впливу на проліферацію та виживання клітин. Усі досліджені лектини спричиняли типові для апоптозу зміни морфології клітини та ядра. Можливо ізолектини ФГА конкурують за одні й ті ж самі мішені, а дія сумарного препарату є результатом такої конкуренції.

Результати, викладені у розділі, були опубліковані у 3х наукових статтях:

1. 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. –Випуск 19, Київ-Луганськ. – С. 250–257.

2 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. – 2011. – Т. 9, Київ - Логос, С.161-165.

3. Вплив фітогемаглютиніну *Phaseolus vulgaris* та його ізоформ на проліферацію та виживання клітин ссавців *in vitro* / Кочубей Т.О., 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.

Результати проведених досліджень доповідалися на вітчизняних та міжнародних конференціях та з'їздах:

1. The influence of lectins on normal and cancer mammalian cell proliferation/ Kochubei T.O., Piven O.O., Karpova I.S, Lukash L.L.// FEBS\SFRR-EIUBMB Advanced Lecture Course "Protein maintenance and turnover in ageing and diseases" Spetses Island, Greece, 4-10 June, 2010

2. Lectins as mediators of normal and cancer cell proliferation and apoptosis /Piven O.O. Kochubei T.O., Karpova I.S, Lukash L.L.// Abstracts of the 44nd Annual Scientific Meeting of the European Society for Clinical Investigation Bari, Italy 24-27 February 2010 volume 40 supplement 1 p. 59

3. 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, - квітень, 2010, С.66-67

4. Comparison of biological activity of lectin PHA and its isoforms on bacterial and human cells / Kochubei T., Piven O., Karpova I., Lukash L.// Polish-Ukrainian Weigl Conference „From microbiology to synthetic biology”, Wroclaw, 18-20 May 2011. Abstracts // Sepsis. – 2011. – Vol. 4, N1. – p.114-115

5. PHA lectins and its isoforms as a modulator of mammalian cells apoptosis/ Kochubei T., O. Piven, V. Andrienko, I. Karpova, L. Lukash// Actin-Based Motility: From Molecules to Model Organisms, 28 жовтня – 2 листопада, Стресса, Італія 2011, P.97

РОЗДІЛ 4

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 автофагію клітин впливаючи на чисельні сигнально-регуляторні механізми, та попередні результати роботи, було зроблено припущення, що лектини ФГА здатні також ініціювати певні сигнальні каскади апоптозу. Тож, наступним логічним етапом роботи було з'ясувати, які саме молекулярні механізми залучені до реалізації апоптичної дії досліджуваних лектинів. Для цього було вирішено проаналізувати зміни рівня експресії медіаторів апоптозу на рівні білка та гена у клітинах ссавців після дії досліджуваних нами лектинів. На цьому етапі роботи ми зосередились на вивченні змін рівнів активованих каспаз 3 та 8 а також про- та антиапоптичних білків – *Bax* та *Bcl2*.

4.1. Вплив сумарного препарату ФГА та його окремих ізолектинів на вміст активованих каспаз та проапоптичного білка *Bax*

Із використанням Вестерн-блот аналізу досліджено зміни експресії ініціаторної каспази-8 та ефекторної каспази-3, а також проапоптичного білка *Bax*. Із застосування ПЛР у реальному часі - проаналізовано зміни рівня експресії генів *Bax* та *Bcl2*. У роботі використовували дві модельні системи: лінію злоякісних клітин раку гортані людини Нер-2 та встановлену лінію клітин людини не пухлинного походження 4BL (детальніше у Розділі 2). На цьому етапі роботи було вирішено зосередитись на вивченні дії лектинів у концентрації 1 мкг/мл, оскільки ця концентрація є найбільш близькою до фізіологічних значень. Окрім того, було показано у попередніх

дослідженнях, що досліджувані у роботі лектини здатні спричиняти загибель клітин навіть при такій незначній концентрації (Розділ 3). У якості позитивного контролю, при проведенні цієї серії експериментів, використовували МННГ, що є активним індуктором апоптозу [118,119], проте його дія опосередкована не через каспазний каскад, а через каспазозалежний механізм із залученням АІФ-білка [120].

За допомогою Вестерн-блот аналізу було виявлено, що і сумарний препарат і його окремі ізолектини спричиняли підвищення рівня експресії проапоптичних білків у обох тест-системах (рис. 4.1- 4.6). Однак, підвищення вмісту проапоптичних білків дещо відрізнялось для різних тест-систем. Так, нами було показано що, обробка еритроаглютиніном клітин 4ВL призводить до значного підвищення вмісту активованих каспази-3 приблизно у 10 разів (рис. 4.1) та каспази-8 приблизно у 12 разів порівняно із контролем (рис. 4.2). Одночасно з цим, вміст активованих фрагментів каспаз був більш ніж у 5 разів вищий порівняно з контролем, після обробки клітин лейкоаглютиніном (рис. 4.1 та 4.2).

Такі дані узгоджуються з результатами, отриманими при дослідженні впливу лектинів ФГА на частоту живих, апоптичних та мертвих клітин у культурі 4ВL (Розділ 3, рис. 3.13). Зауважимо, що за умов експерименту, саме дія еритроаглютиніну призводила до значного підвищення порівняно з контролем відсотку апоптичних та мертвих клітин у досліджуваній культурі клітин не пухлинного походження (рис. 3.13-3.15).

Сумарний препарат ФГА та лейкоаглютинін спричиняли підвищення вмісту активованих каспази-3 та -8 більш ніж у 3 рази порівняно із контролем, у цій же тест-системі, але їхні рівні були значно нижчими порівняно із дією еритроаглютиніну (рис. 4.1 та 4.2). Цікаво, що за результатами мікрокультурального тесту (рис. 3.3.) та кількісному аналізі клітин (рис. 3.13 та 3.14) лейкоаглютинін не спричиняв значного підвищення кількості апоптичних клітин у культурі 4ВL, та діяв як мітоген (рис.3.3). Але при цьому було виявлено підвищення кількості активованих каспази-3 та -8

порівняно із контролем (рис. 4.1 та 4.2). Можливо такі зміни рівня активованих каспази-3 та -8 при обробці лейкоаглютиніном обумовлюються активацією клітинного циклу та активною проліферацією клітин 4BL.

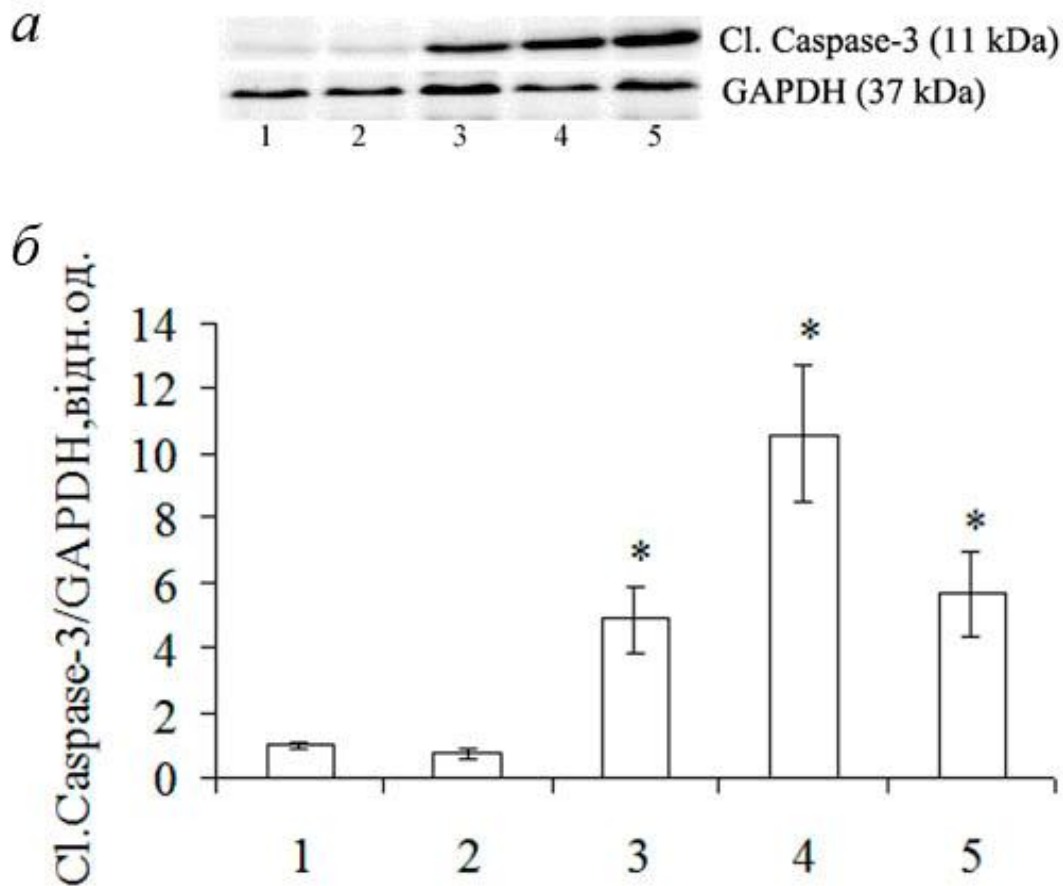


Рис. 4.1. Вміст розщепленої форми каспази 3 у клітинах 4BL після обробки ФГА та його окремими ізолектинами (1 мкг/мл). Тривалість обробки становила 4 години; *a* – Вестерн блот аналіз тотальних лізатів клітин з використанням специфічних антитіл; *b* – відносний рівень розщепленої каспази 3; ФГА-Е – еритроаглютинін, ФГА-Л – лейкоаглютинін, ФГА – сумарний препарат фітогемаглютиніну, GAPDH- гліцеральдегід-фосфат-дегідрогеназа; 1 - контроль, 2 - МННГ, 3 – ФГА, 4 – ФГА-Е, 5 – ФГА-Л; * – достовірна різниця у показниках щодо контролю ($p \leq 0,05$ $n=3$)

Можливо такі зміни рівня активованих каспази-3 та -8 при обробці лейкоаглютиніном обумовлюються активацією клітинного циклу та

активною проліферацією клітин 4BL. Як відомо з літературних даних, при поділі клітин ссавців відбуваються фізіологічні розриви ДНК, активація систем репарації та можливо апоптозу для підтримки стабільності клітинної популяції [121].

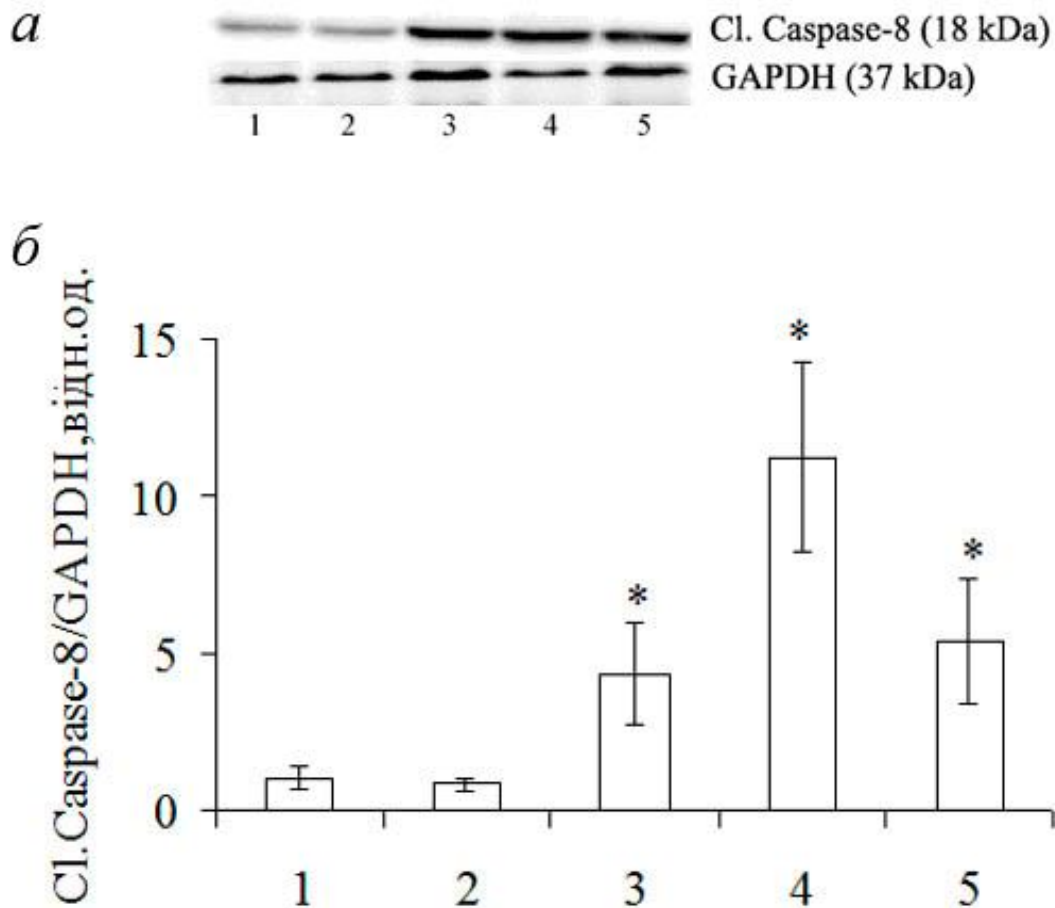


Рис. 4.2. Вміст розщепленої форми каспази 8 у клітинах 4BL після обробки ФГА та його окремими ізолектинами (1 мкг/мл). Тривалість обробки становила 4 години; *a* – Вестерн блот аналіз тотальних лізатів клітин з використанням специфічних антитіл; *b* – відносний рівень каспази 8, ФГА-Е – еритроаглютинін, ФГА-Л – лейкоаглютинін, ФГА – сумарний препарат фітогемаглютиніну, GAPDH- гліцеральдегід-фосфат-дегідрогеназа; 1 – контроль, 2 - МННГ, 3 – ФГА, 4 – ФГА-Е, 5 – ФГА-Л; □ – достовірна різниця у показниках щодо контролю ($p \leq 0,05$; $n=3$)

Також ми проаналізували і зміни рівня експресії білка Вах в клітинах культури 4BL після обробки лектинами, оскільки відомо (Розділ 1), що він приймає участь у ініціації мітохондріального шляху апоптозу. У результаті нами було виявлено, що під впливом всіх досліджуваних лектинів відбувається підвищення рівня цього білка відносно контролю (рис. 4.3).

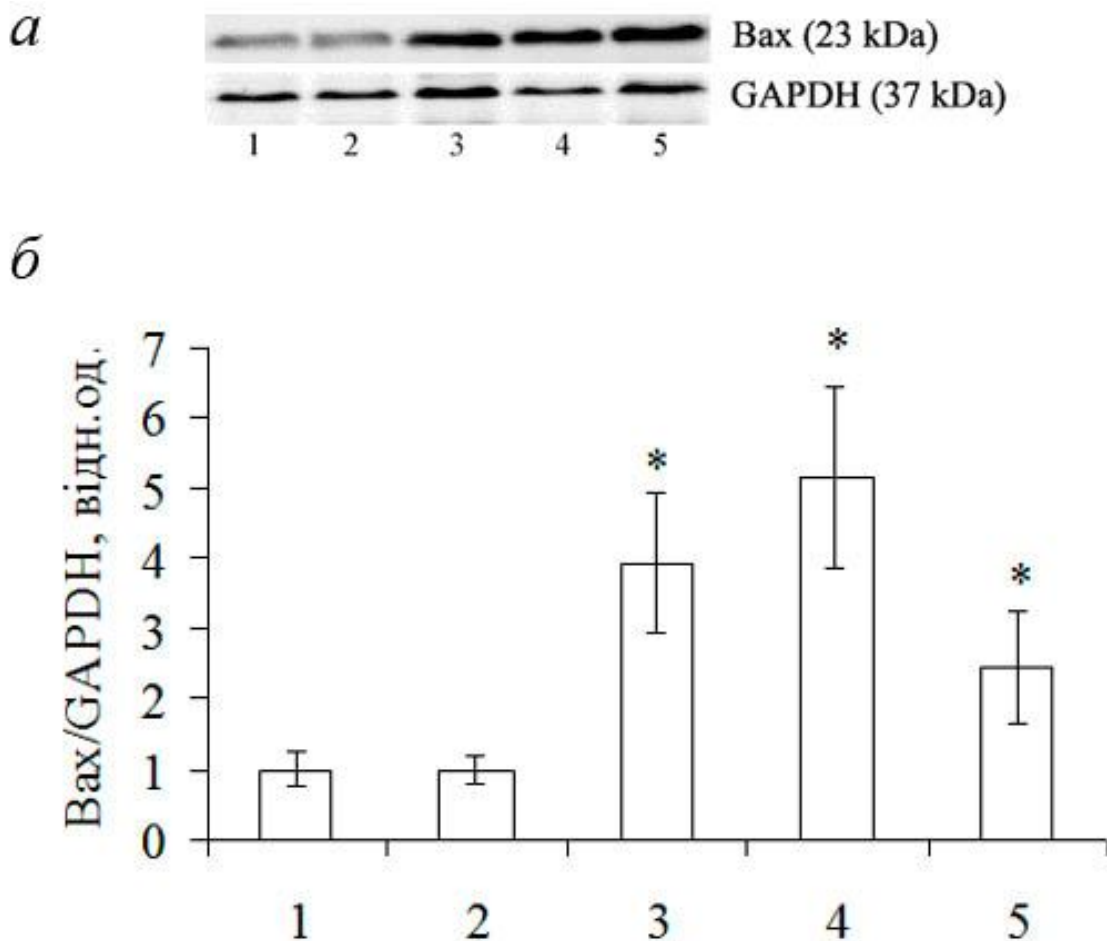


Рис. 4.3. Вміст білка Вах після обробки клітин 4BL ФГА та його окремими ізолектинами (1 мкг/мл). Тривалість обробки становила 4 години; *a* – Вестерн блот аналіз тотальних лізатів клітин з використанням специфічних антитіл; *b* – відносний рівень білка Вах; ФГА-Е – еритроаглютинін, ФГА-Л – лейкоаглютинін, ФГА – сумарний препарат фітогемаглютиніну, GAPDH – гліцеральдегід-фосфат-дегідрогеназа; 1 - контроль, 2 - МННГ, 3 – ФГА, 4 – ФГА-Е, 5 – ФГА-Л; * – достовірна різниця у показниках щодо контролю ($p \leq 0,05$; $n=3$)

При цьому найвищий вміст білка Вах (приблизно у 5 разів порівняно з контролем) спостерігався після обробки клітин еритроаглютиніном. Це може свідчити про більш виражений проапоптичний ефект цього ізолектину порівняно з сумарним препаратом ФГА та ФГА-Л, а також більш універсальний механізм його дії. Ймовірно, ФГА-Е здатен індукувати загибель клітин активуючи обидві ланки апоптозу. Найменш виражену індукуючу дію 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. 4.3), що може свідчити про вибіркочну індукцію цим лектином саме мітохондріального сигнального шляху апоптозу.

Як вже було зазначено, характер біологічної дії трьох препаратів дещо відрізнявся залежно від обраної тест-системи. Так, із використанням культури клітин раку гортані, також спостерігалось статистично достовірне підвищення рівня активованої каспази-3 порівняно із контролем після дії усіх трьох досліджуваних лектинів (рис. 4.4).

Аналогічно із попередньою тест системою, найбільш активним індуктором каспази-3 виявився еритроаглютинін, тут вміст розщеплених фрагментів каспази-3 був у 4 рази вищим порівняно із контролем і майже у двічі порівняно із дією двох інших білків (рис. 4.4). Ці дані узгоджуються із результатами кількісного аналізу розподілу клітин на ранній стадії після дії лектинів (рис. 3.7). У цій серії експериментів, саме через 4 години після обробки лектинами ми також спостерігали найвищий відсоток апоптичних клітин саме після дії еритроаглютиніну, приблизно 80%.

Цікаво однак, що найвищий вміст розщеплених фрагментів ініціаторної каспази-8 спостерігалось після обробки клітин Нер-2 не еритроаглютиніном, а сумарним препаратом ФГА (рис. 4.5). Еритроаглютинін та лейкоаглютинін також індукували підвищення вмісту цієї каспази у культурі клітин Нер-2

приблизно у 5 разів більше порівняно із контролем, однак ці значення були майже вдвічі нижчими порівняно із такими після дії сумарного ФГА (рис. 4.5).

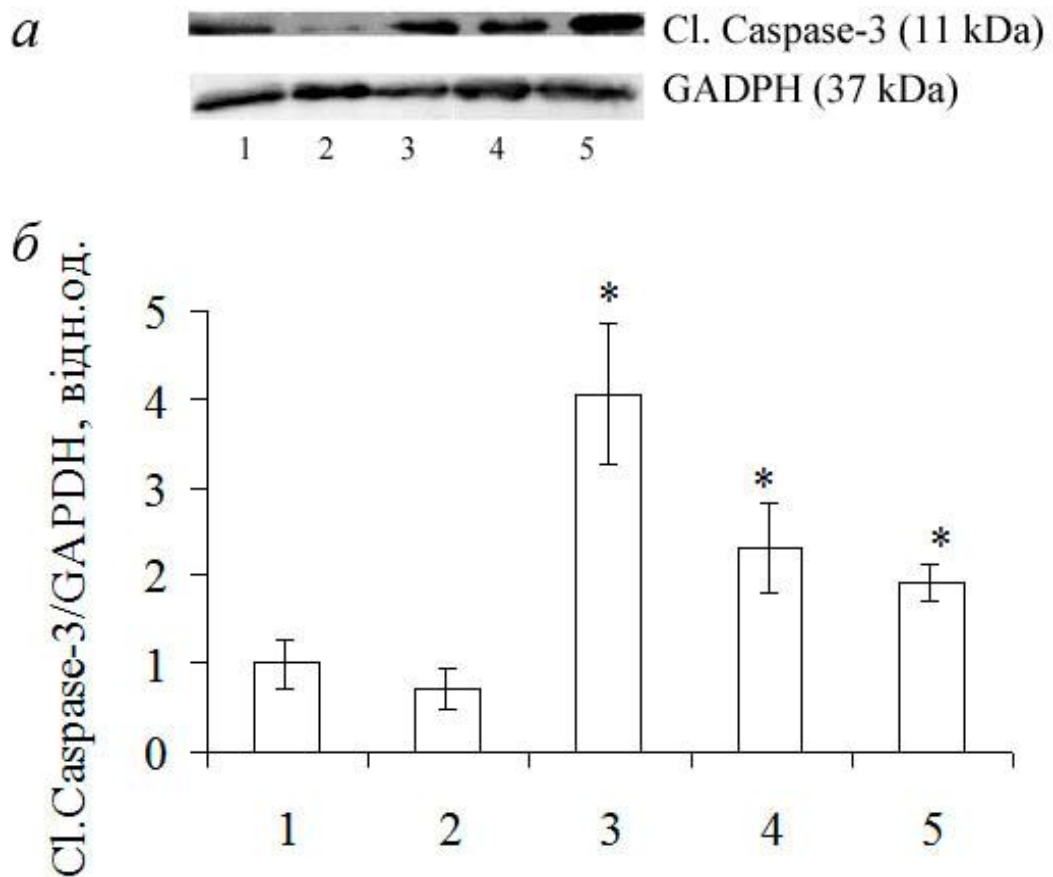


Рис. 4.4. Вміст розщепленої форми каспази 3 у клітинах Нер-2 після обробки ФГА та його окремими ізолектинами (1 мкг/мл). Тривалість обробки становила 4 години; *a* – Вестерн блот аналіз тотальних лізатів клітин з використанням специфічних антитіл; *б* – відносний рівень розщепленої форми каспази 3 ; MNNG – N-метил-N'-нітро-N-нітрозогуанідин, ФГА-Е – еритроаглютинін, ФГА-Л – лейкоаглютинін, ФГА сумарний препарат фітогемаглютиніну, GADPH- гліцеральдегід-фосфат-дегідрогеназа; 1 - контроль, 2 - MNNG, 3 – ФГА-Е, 4 – ФГА-Л, 5 – ФГА □ – достовірна різниця у показниках щодо контролю ($p \leq 0,05$; $n=3$)

Аналіз змін вмісту проапоптичного білка Вах виявив, що на відміну від попередньої тест-системи (рис. 4.3) у культурі клітин Нер-2 усі досліджувані

лектини спричиняли підвищення вмісту останнього майже у 2,5 рази порівняно із контролями (рис. 4.6).

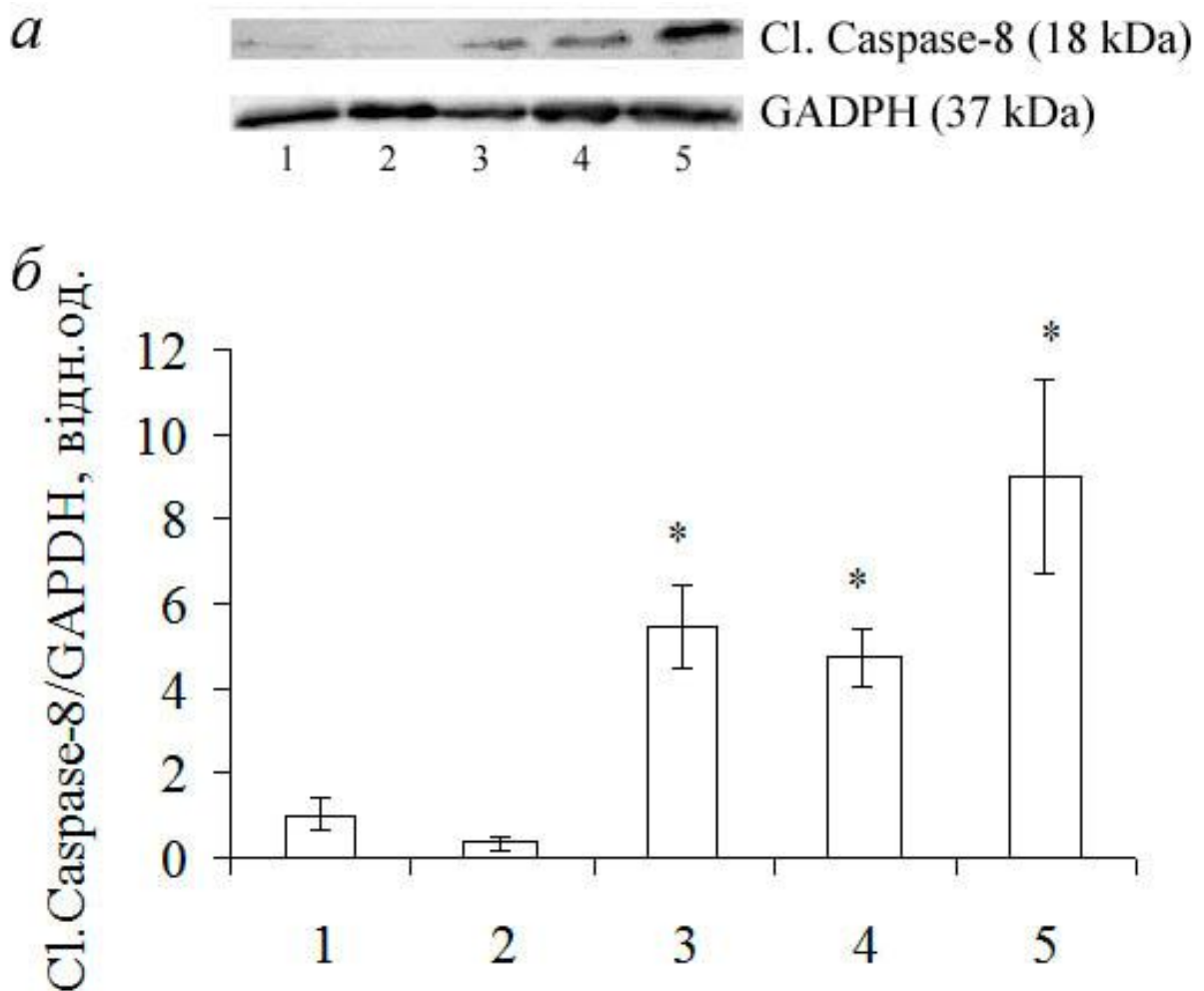


Рис. 4.5. Вміст розщепленої форми каспази 8 у клітинах Нер-2 після обробки ФГА та його окремими ізолектинами (1 мкг/мл). Тривалість обробки становила 4 години; *a* – Вестерн блот аналіз тотальних лізатів клітин з використанням специфічних антитіл; *б* – відносний рівень каспази 8; MNNG – N-метил-N'-нітро-N-нітрозогуанідин, ФГА-Е – еритроаглютинін, ФГА-Л – лейкоаглютинін, ФГА – сумарний препарат фітогемаглютиніну, GADPH – гліцеральдегід-фосфат-дегідрогеназа; 1 - контроль, 2 - MNNG, 3 – ФГА, 4 – ФГА-Е, 5 – ФГА-Л * – достовірна різниця у показниках щодо контролю ($p \leq 0,05$; $n=3$)

Сумарний препарат та еритроаглютинін підвищували вміст білка Вах на одному рівні, дещо нижчим такий рівень був після дії лейкоаглютиніну.

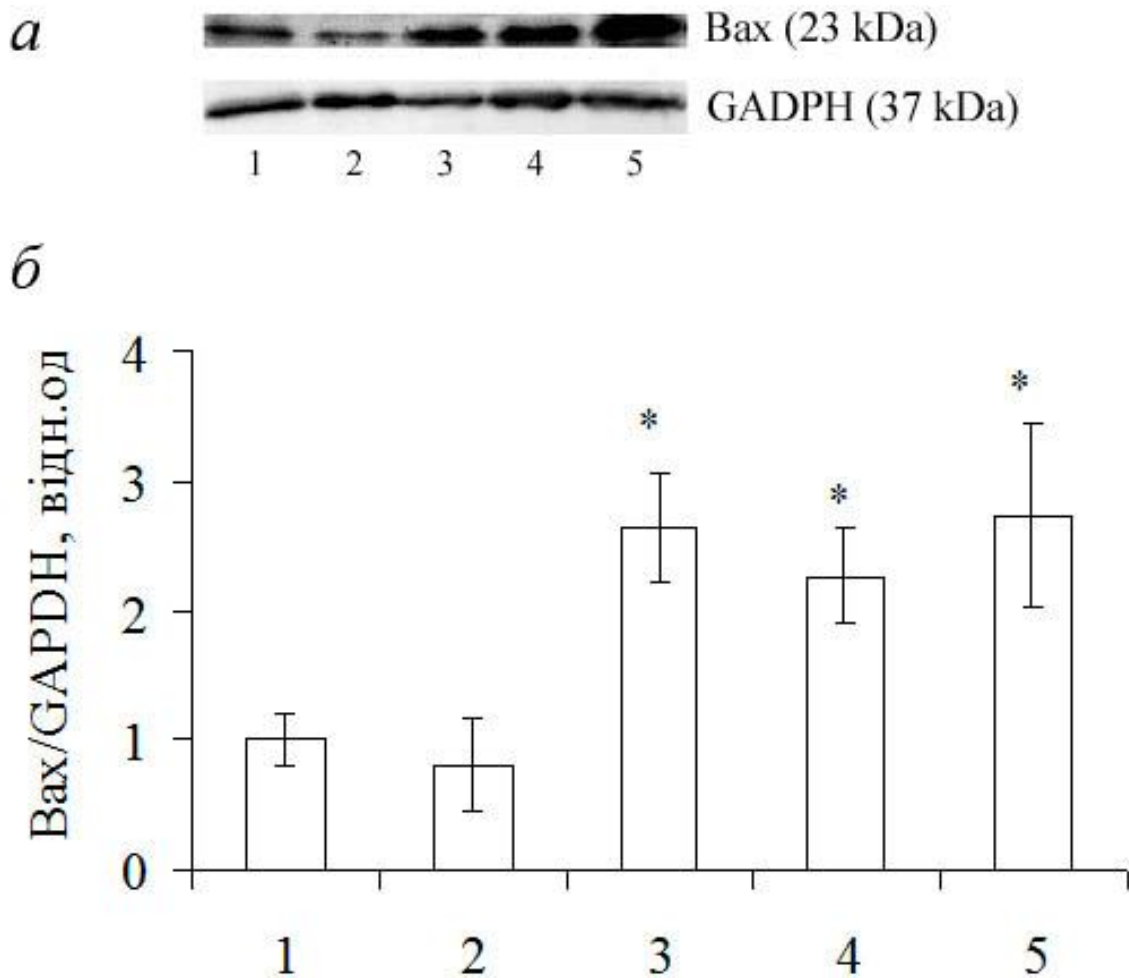


Рис. 4.6. Вміст білка Вах у клітинах Нер-2 після обробки ФГА та його окремими ізолектинами (1 мкг/мл). Тривалість обробки становила 4 години; *a* – Вестерн блот аналіз тотальних лізатів клітин з використанням специфічних антитіл; *б* – відносний рівень білка Вах; MNNG – N-метил-N'-нітро-N-нітрозогуанідин, ФГА-Е – еритроаглютинін, ФГА-Л – лейкоаглютинін, ФГА – сумарний препарат фітогемаглютиніну, GADPH – гліцеральдегід-фосфат-дегідрогеназа; 1 - контроль, 2 - MNNG, 3 – ФГА, 4 – ФГА-Е, 5 – ФГА-Л; * – достовірна різниця у показниках щодо контролю ($p \leq 0,05$; $n=3$)

Отже, усі досліджені у роботі 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 (детально у Розділі 1) ініціювати апоптоз саме через активацію мітохондріального та/або рецептор-залежного шляхів. Однак, стосовно ФГА така дія не була показана. Лише нещодавно, фактично одночасно із представленою роботою, було показано, що еритроаглютинін може спричиняти апоптоз у клітинах раку легень людини ініціюючи мітохондріальний шлях апоптозу [8].

4.2. Дослідження змін експресії про- та антиапоптичних генів (*Bax* та *Bcl2*) у клітинах ссавців під впливом лектинів ФГА

Зважаючи на результати Вестерн-блот аналізу було вирішено проаналізувати і зміни рівня експресії деяких генів залучених до контролю апоптозу у клітині. Із застосуванням зворотньоотранскриптажної ПЛР у реальному часі було показано, що усі три досліджувані лектини спричиняли статистично достовірне підвищення експресії проапоптичного гена *Bax* у культурі клітин раку гортані людини порівняно з контролем (рис. 4.7). Дані ПЛР у реальному часі цілком узгоджуються із результатами Вестерн-блот аналізу (рис. 4.6). Загалом рівень експресії гена *Bax* був майже у 2,5 рази вищий після дії сумарного препарату ФГА та лейкоаглютиніну і майже у 3,5 вищий після обробки клітин Нер-2 еритроаглютиніном порівняно із контролем (рис 4.7).

Отримані результати свідчать, що усі три досліджувані лектини здатні ініціювати як рецептор залежний, так і мітохондріальний сигнальні каскади апоптозу у злоякісних клітинах. Варто зауважити, що на відміну від попередньої тест-системи, у культурі клітин раку гортані, сумарний препарат лектину досить ефективно спричиняв підвищення рівню каспази-8 та проапоптичного білка *Bax* (рис. 4.5 та 4.6). Такі результати дають змогу припустити, що саме сумарний препарат ФГА однаково ефективно ініціює і рецептор-залежний і мітохондріальний сигнальні каскади апоптозу у клітинах раку гортані людини.

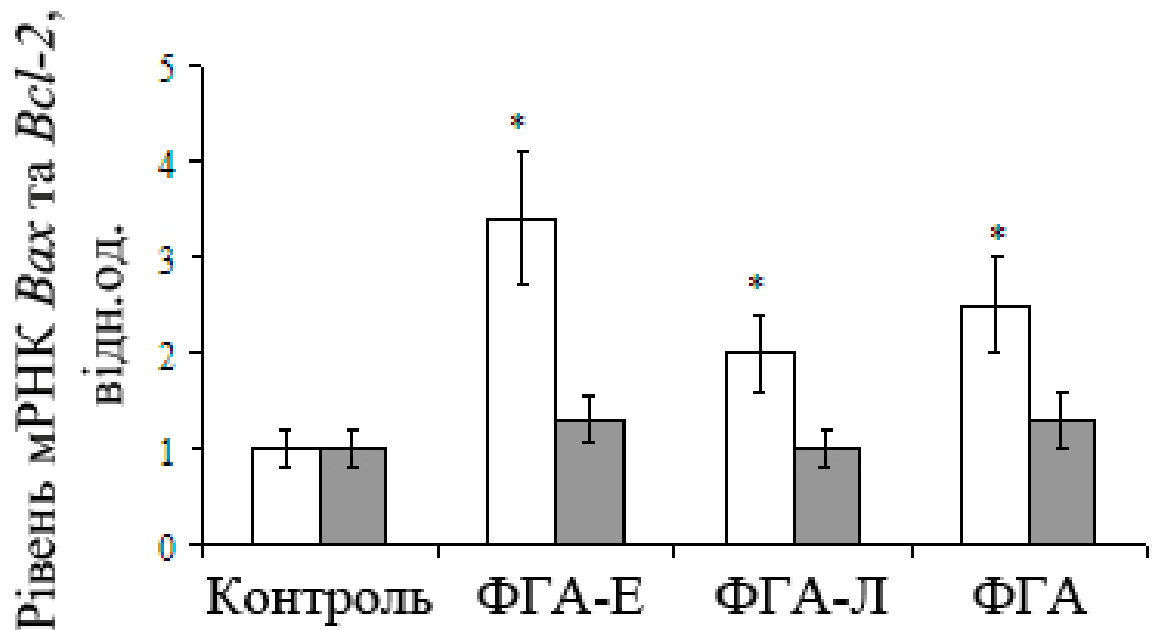


Рис. 4.7. Експресія генів *Bax* та *Bcl-2* в клітинах Нер-2 після обробки лектинами (рівень мРНК за даними ПЛР у реальному часі). *Достовірна різниця у показниках щодо відповідного контролю ($p \leq 0,05$, $n=3$); \square – *Bax*; \blacksquare – *Bcl-2*

Грунтуючись на даних Вестерн-блот аналізу та ПЛР у реальному часі можна також висунути припущення, що еритроаглютинін здатен спричиняти програмовану гибель клітини переважно через активацію мітохондріального шляху апоптозу. Аналізуючи зміни рівня експресії проапоптичного гена *Bax* у культурі клітин 4BL ми також виявили суттєве підвищення рівня його експресії після обробки клітин еритроаглютиніном та лейкоаглютиніном (рис. 4.8).

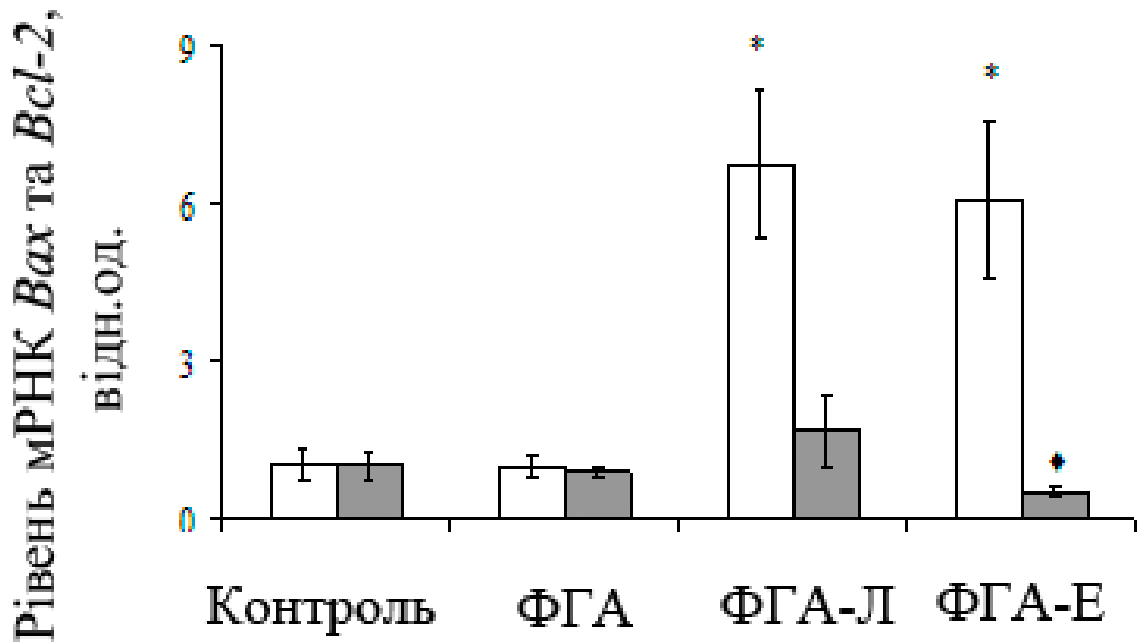


Рис. 4.8. Експресія генів *Vax* та *Vcl-2* в клітинах 4BL після обробки лектинами (рівень мРНК за даними ПЛР у реальному часі). Достовірна різниця у показниках щодо відповідного контролю :* для *Vax*, ♦ для *Vcl-2*. ($p \leq 0,05$, $n=3$); □ – *Vax*; ■ – *Vcl-2*

Рівень експресії *Vax* був майже у шість разів вищий порівняно із контролем (рис. 4.8) після обробки клітин непухлинного походження лейкоаглютиніном та еритроаглютиніном. Ці результати узгоджуються із результатами Вестерн-блот аналізу (рис. 4.3) де спостерігалось суттєве підвищення рівня експресії білка *Vax* у цих дослідних варіантах. Однак у даному експерименті не вдалося зареєструвати підвищення експресії гена *Vax* у культурі клітин 4BL після дії сумарного препарату ФГА (рис 4.8). Такий феномен може мати кілька пояснень і одне із них - це пригнічення експресії гена *Vax* у культурі клітин 4BL за рахунок порушення або затримки протеасомної деградації білка (Розділ 1), саме при дії сумарного препарату ФГА.

Із застосуванням ПЛР у реальному часі також було 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 ми не спостерігали статистично достовірного підвищення експресії гена *Bcl2* (рис. 4.7 та 4.8).

В усіх експериментах рівень експресії цього гена лишався на рівні з інтактним контролем і лише у випадку обробки клітин лінії 4ВL еритроаглютиніном рівень експресії гена *Bcl2* статистично достовірно знижувався порівняно із іншими варіантами у досліді (рис. 4.8).

Таким чином, з використанням Вестерн блот аналізу та ПЛР у реальному часі було встановлено, що сумарний препарат ФГА та його окремі ізолектини здатні ініціювати як рецептор-залежний, так і мітохондріальний сигнальні шляхи апоптозу. Було встановлено, що еритроаглютинін виявився більш ефективним індуктором як активованих каспаз 3 та 8, так і проапоптичного білка Вах у культурі клітин непухлинного походження 4ВL. У культурі клітин раку гортані еритроаглютинін з вищою ефективністю ініціював каспазу 3, тоді як сумарний препарат фітогемаглютиніну – каспазу 8.

Результати, викладені у розділі 4, були опубліковані у 3х статтях:

1. Ізоформи фітогемаглютиніну як індуктори апоптозу пухлинних клітин *in vitro* / Кочубей Т.О., Максимчук О.В. Мацевич Л.Л. Півень О.О. Лукаш Л.Л. // Вісн. Укр. тов-ва генетиків і селекціонерів. – 2013. –Т.11, № 2. – С. 226–233.

2. Проапоптичні властивості сумарного препарату фітогемаглютиніну та його окремих ізолектинів у культурі клітин людини 4ВL / Кочубей Т.О., Максимчук О.В. Мацевич Л.Л. Півень О.О. Лукаш Л.Л.// Український біохімічний журнал. – 2014.- –Т. 86, № 4. – С. 103–109.

3. 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 // Experimental oncology. – 2015. – Vol. 37, N 2. – P. 116-119.

Результати проведених досліджень доповідалися на вітчизняних та міжнародних конференціях та з'їздах:

1. Lectin phytohemagglutinin and its isoforms as modulators of the proliferation and apoptosis on human cancer cells in vitro / Kochubei T., Piven O., Andrienko V., Lukash L.// Single Cell Physiology International EMBO workshop.- Paris, France 23-28 July 2012

2. Influence of Phytohemagglutinin and its isoforms on the proliferation and apoptosis of human's cancer cells / Kochubei T., Piven O., Andrienko V., Карпова І., Lukash L// 3-й з'їзд Українського товариства клітинної біології з міжнародним представництвом- Ялта, Лівадія - травень 16-29 , 2012 ст.89

3. Apoptosis-dependent cell death in tumor cells induced by phytohemagglutinin/ Kochubei T., Piven O., Lukash L.// Hereditary and Familial Cancer In The Personal Genomics Era. A joint event: IV Annual IMPPC Conference 1st ICO-IDIBEL Hereditary Cancer Program Meeting 14-15 March 2013 Barcelona, Spain.

4. Investigation of proapoptotic activity of phytohemagglutinin and its individual isolectins in human cell culture/ Kochubei T., Piven O., Lukash L.// Матеріали 4-го З'їзду Українського товариства клітинної біології з міжнародним представництвом- Ужгород, - вересень 17-20 , 2014.-С.114.

5. Phytohemagglutinin and its individual lectins as inductor of apoptosis in human cell 4BL /Kochubei T., Ruban T., Piven O., Lukash L// БюллетеньXIV чтений им.В.В.Подвысоцкого 27-28 мая 2015 Одесса.-С.8.

РОЗДІЛ 5

МОЛЕКУЛЯРНЕ МОДЕЛЮВАННЯ БЛОК-БІЛКОВОЇ ВЗАЄМОДІЇ ЛЕЙКОАГЛЮТИНІНУ З ПРО- ТА АНТИАПОПТИЧНИМИ РЕЦЕПТОРАМИ КЛІТИННОЇ МЕМБРАНИ

Ґрунтуючись на отриманих даних про здатність сумарного препарату ФГА і його окремих ізолектинів впливати на проліферацію клітин ссавців та спричиняти їхню загибель, було зроблено припущення, що досліджувані у роботі лектини здатні активувати сигнальні каскади апоптозу. Таке припущення ґрунтується не лише на власних спостереженнях, а й поодиноких експериментальних даних інших груп науковців. Так нещодавно було показано, що деякі ізоформи рослинних не токсичних лектинів здатні спричиняти апоптоз і автофагію у злоякісних клітинах, модулюючи ключові у цих процесах білки та сигналінги, включаючи: Bcl-2, каспази, p53, PI3K/Akt, ERK (extracellular signal-regulated kinase), BNIP3(BCL2 interacting protein 3), Ras-Raf та ATG [58]. Незалежно, однак одночасно із представленими у роботі дослідженнями, для еритроаглютиніну було експериментально встановлено, що він може спричиняти апоптоз у клітинах раку легень людини ініціюючи мітохондріальний сигнальний каскад [10].

Як вже було згадано, вуглевод-білкові взаємодії є основним із механізмів реалізації біологічної активності лектинів. Однак, можна припустити, що механізми взаємодії клітини-реципієнта і лектину значно складніші, і у реалізації апоптичної дії лектинів приймають участь не лише вуглевод-білкові взаємодії, а й білок-білкові взаємодії лектинів та рецепторів що контролюють клітинний цикл та апоптоз.

Тож для перевірки такого припущення було виконано молекулярне моделювання можливих взаємодій лектинів ФГА та рецепторів клітинної мембрани залучених до контролю проліферації та апоптозу. Для цього було

застосовано докінг аналіз (детально у підрозділі 2.5.) при проведенні якого використовували 3D структури із Protein Data Bank [<http://www.rcsb.org>]. У якості розрахункової моделі використали єдину розраховану модель для лейкоаглютиніну - 1FAT [122]. Для аналізу білок-білкових взаємодій, молекулярної динаміки та енергетики зв'язування між лектином і рецепторами смерті використали моделі для Fas рецептору (FasR) та фактору некрозу пухлин (TNF1R) 1FT4 та 3NW5 відповідно [123,124]. Також було проаналізовано можливу молекулярну взаємодію між лейкоаглютиніном та рецепторами залученими до контролю проліферації, використовуючи просторові структури інсулін-залежного фактору росту 1 (IGF1R) та епідермального фактору росту (EGFR) 3TJE і 3U7U відповідно [125-127].

Оцінку загальної взаємодії лектину та рецепторів проводили за допомогою програми ArgusLab. Загальну енергію обчислювали, як суму енергії зв'язків, кутів між зв'язками, дигедральних кутів, неправильних торсійних кутів та ван-дер-ваальсових взаємодій, використовуючи силове поле UFF.

У результаті проведеного аналізу було отримано оптимальні просторові структури комплексів лейкоаглютиніну та рецепторів. Варто зауважити, що усі змодельовані комплекси характеризуються високою енергією зв'язування (табл. 5.1.) і це свідчить про можливу специфічність зв'язування лейкоаглютиніну як з про- так і з антиапоптичними рецепторами. Загалом було отримано кілька комплексів лейкоаглютинін-рецептор (рис. 5.1) і найбільшою енергією зв'язування характеризується модель білок-білкової взаємодії між лейкоаглютиніном та TNF1R ($-\Delta G_{Gibbs} = 863,8 \text{ kJ/mole}$). Цей комплекс характеризується також великою областю контакту

лейкоаглютиніну та рецептору, а характер їхньої взаємодії можна описати за принципом «ключ-замок» (рис. 5.1, а).

Таблиця 5.1.

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

Інші отримані в роботі комплекси характеризувались дещо меншою енергією зв'язування порівняно із комплексом лейкоаглютинін – TNF1R. Загалом складається враження, що лейкоаглютинін здатен специфічно зв'язуватись як із про-, так і антиапоптичними рецепторами, однак комплекси ФГА-Л із рецепторами смерті мають дещо вищу енергію зв'язування (табл 5.1.). Відомо, що і FasR і TNF1R відносяться до родини рецепторів смерті і їхня активація призводить до залучення прокаспаз 8 до утворення так званого комплексу, що індукує смерть (DISC). Ця подія призводить до протеолітичної активації про-каспаз 8 та подальшої активації каспаз 3 та 7, та як наслідок до ініціації деградації клітини і апоптозу [12].

Отримані оптимізовані просторові структури лейкоаглютиніну із рецепторами інсулін-залежного фактору росту 1 (IGF1R) та епідермального фактору росту (EGFR) мають дещо меншу енергію зв'язування 567,4 та 609,4 kJ/mole ($-\Delta G_{\text{Gibbs}}$) відповідно і характеризуються меншою областю контакту білків (рис. 5.1. в, г).

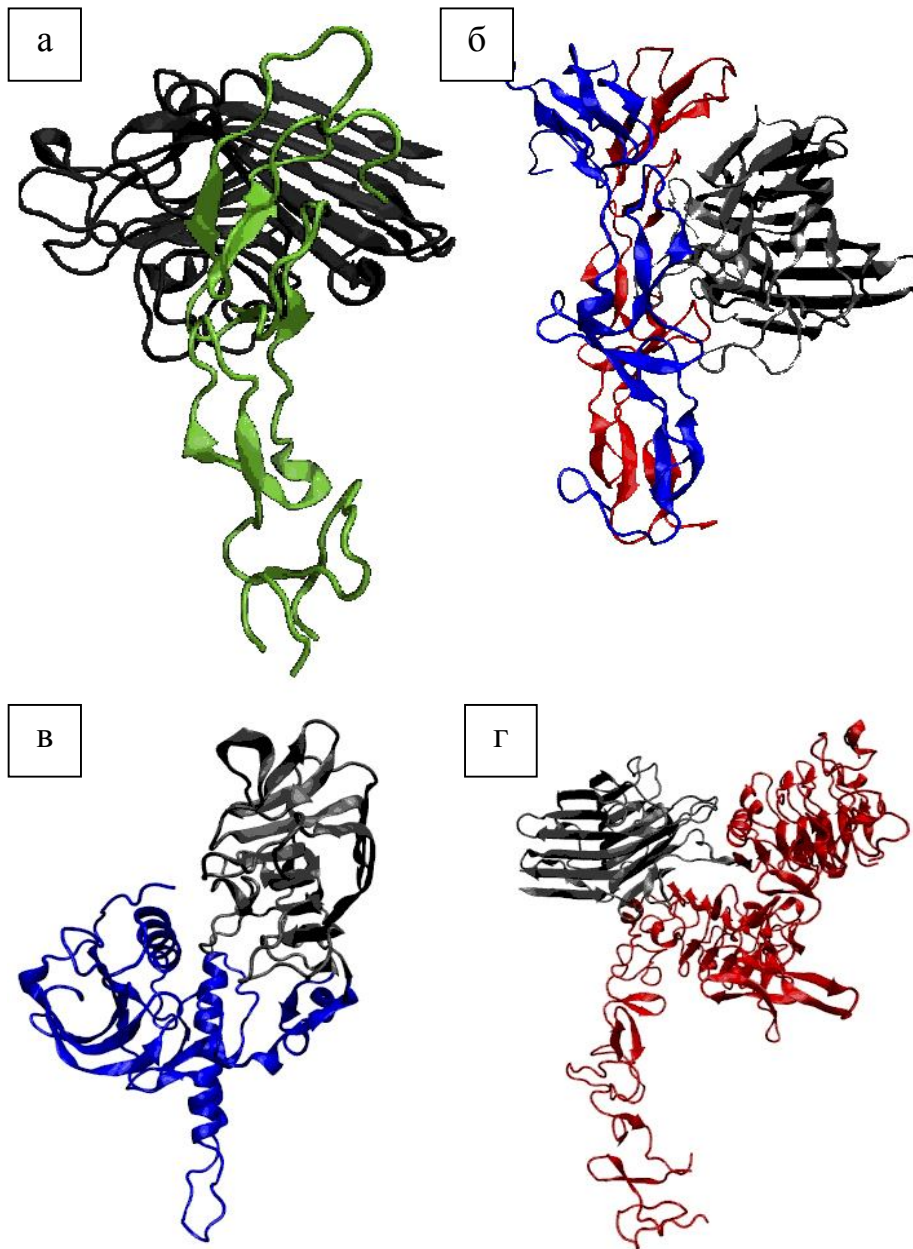


Рис. 5.1. Комплекси лейкоаглютиніну (ФГА-Л) з рецепторами: *a* – FasR (структуру рецептору позначено зеленим); *б* – TNF1R (позначено синім та червоним); *в* – IGF1R (позначено синім); *г* – EGFR (позначено червоним); структуру ФГА-Л зображено чорним кольором

За літературними даними відомо, що дисрегуляція сигнально регуляторних шляхів клітини через підвищену експресію чи конститутивну активацію рецепторів EGFR або IGF1R у клітинах людини спричиняє туморогенез включаючи підвищення ангиогенезу та метастазування [128]. Відомо також, що обидва ці рецептори залучені у активацію PI-3K/Akt сигнального шляху, що спричиняє фосфорилування білка Bad і в решті решт виживання клітин [128,129].

Ймовірно лейкоаглютинін здатен високо специфічно інгібувати EGFR та/або IGF1R залежні сигналінги у клітині, і таке припущення підтверджується не лише результатами проведеного докінг аналізу, а й експериментальними даними Куо та співавторів. Так, із використанням культури клітин раку легень людини авторами було показано, що еритроаглютинін інгібує EGFR залежний сигнальний каскад, що призводить і до пригнічення PI3K/Akt сигналінгу [8]. Порівнюючи результати роботи та нещодавно опубліковані дані математичного моделювання, проведеного для рецептору EGFR та потенційних антитіл, здатних блокувати його активність, можемо сказати, що лейкоаглютинін має високий потенціал до взаємодії з цим рецептором у живій клітині.

Так авторами, Kado та колегами, було показано, що серед розроблених антитіл, що імітують EGF (Epregrulin ligand - специфічний ліганд рецептору EGFR) інгібуючу рецептор дію, у експерименті, мали лише ті, для яких була передбачена найвища енергія зв'язування [130]. А саме, вона становила: -204 та -147 kJ/mole, варто зауважити, що ці значення майже втричі та двічі нижчі за значення отримані нами для лейкоаглютиніну.

Отже, ґрунтуючись на результатах молекулярного моделювання можна припустити, що лейкоаглютинін здатен специфічно зв'язуватись із рецепторами на поверхні клітинної мембрани, що контролюють проліферацію, ріст та сигнальні стимули апоптозу і у такий спосіб моделювати зазначені процеси. Отримані дані узгоджуються із попередніми

результатами роботи (Розділ 3 та 4). Лейкоаглютинін і, можливо, інші лектини ФГА здатні утворювати білок-білкові комплекси із рецепторами смерті (FasR і TNF1R) ініціюючи програмовану загибель клітини. Окрім того, лейкоаглютинін здатен ініціювати сигнальні каскади апоптозу інгібуючи антиапоптичні рецептори клітини та IGF1R і EGFR-залежні сигналінги. Однак, здатність лейкоаглютиніну, та можливо, і еритроаглютиніну і сумарного препарату ФГА утворювати білок-білкові комплекси із зазначеними вище рецепторами повинна бути перевірена у експерименті із застосуванням сучасних методів молекулярної біології і генетики.

Наразі, можна підсумувати, що і представлені у роботі, і літературні дані свідчать про те, що лектини на прикладі ФГА-Л, здатні не лише до вуглевод-білкових а й білок-білкових взаємодій. Можливо, така властивість і пояснює широкий спектр їхньої дії та складні концентраційні залежності їхнього впливу. Також варто зауважити, що лектини фітогемаглютиніну є досить цікавими і перспективними білками із точки зору потенційного застосування при розробці ефективної протипухлинної терапії у майбутньому.

Таким чином, із застосуванням методу молекулярного моделювання вперше було показано, що лейкоаглютинін здатен утворювати білок-білкові комплекси як з «проапоптичними» рецепторами (FasR і TNF1R), так і «антиапоптичними» рецепторами (IGF1R і EGFR) клітини. Було показано, що такі комплекси характеризуються високою енергією зв'язування, що може свідчити про специфічність білок-білкової (лектину з рецептором) взаємодії.

Отримані дані надають можливість зробити припущення, що досліджувані в роботі лектини здатні ініціювати апоптоз опосередковано через взаємодію із рецепторами смерті та росту, і важливим фактором для такого впливу є саме білок-білкова взаємодія лектину та рецептору.

Результати проведених досліджень доповідалися на міжнародній конференції:

1. Kochubei T., Kitam V., Maksymchuk O., Piven O., Lukash L.
Possible mechanisms of leukoagglutinin induced apoptosis in human cells *in vitro*.
// Materials of International Symposium on Cell Biology jointly with 5th Ukrainian Congress for Cell Biology, 2-6 жовтня 2016, Одеса, Україна.

РОЗДІЛ 6

АНАЛІЗ І УЗАГАЛЬНЕННЯ РЕЗУЛЬТАТІВ ДОСЛІДЖЕНЬ

У результаті проведених в представленій роботі досліджень отримано відповідь на основне питання, поставлене на початку цієї роботи: чи здатен мітоген – лектин квасолі звичайної, індукувати програмовану гибель клітин ссавців. Та який можливий механізм реалізації проапоптичної дії лектину ФГА та його окремих ізолектинів.

Дійсно, у результаті проведеної роботи, було встановлено, що фітогемаглютинін та його окремі ізолектини здатні модулювати проліферацію клітин ссавців в умовах *in vitro*. Так, було показано, що досліджувані лектини мають як мітогенну, так і цитостатичну/інгібуючу проліферацію дію. Характер біологічної дії трьох препаратів (сумарного ФГА, лейкоаглютиніну та еритроаглютиніну) відрізнявся залежно від обраної тест-системи і концентрації лектинів. Так, наприклад, із використанням культури клітин раку гортані людини Нер-2 досліджувані у роботі лектини не виявляли мітогенної активності, на відміну від дослідів з використанням клітин китайського хом'ячка та культури умовно нормальних клітин людини 4BL.

Дані представленої роботи узгоджуються з результатами інших наукових груп, де було показано, що сумарний препарат ФГА має цитостатичну дію та здатен інгібувати проліферацію клітин людини різних ліній: Hs729 (НТВ-153), SK-UT-1, SK-LMS-1 та клітин мієломи людини SP2 [131-133].

Здатність ФГА інгібувати проліферацію клітин також було виявлено із використанням тваринних моделей. Так, було показано, що присутність ФГА у певній кількості у раціоні лабораторних мишей з лімфомою мало цитотоксичний вплив на злоякісні клітини [134]. Пізніше було показано, що низькі дози лектину ФГА пригнічували метастазування, ангиогенез пухлини

та мали цитотоксичну дію проти клітин міеломи, карциноми січового міхура та раку легень у мишей [135-137].

Однак, у представленій роботі вперше було проаналізовано дію не лише сумарного препарату ФГА, але й його окремих ізолектинів із застосуванням як злоякісних, так і умовно нормальних клітин ссавців. Було виявлено не лише більш виразне інгібування проліферації злоякісних клітин лектинами ФГА порівняно із умовно нормальними клітинами, але й спостерігалась деяка різниця між ефектами дії сумарного препарату та його окремих ізолектинів.

Так, у культурах клітин людини найбільш яскраво виражений цитостатичний/інгібуючий ефект мав лейкоаглютинін, а у культурі клітин китайського хом'ячка – еритроаглютинін та сумарний препарат лектину.

Загальновідомо, що сумарний препарат ФГА має вуглеводну специфічність до олігосахаридів, а окремі ізолектини, наприклад, лейкоцитарна - до вуглеводів, що містять манозу, на відміну від еритроцитарної, що має вуглеводну специфічність до двоантенних глікопротеїнів, що містять галактозу [6]. Окрім того було показано, що лейкоаглютинін ФГА-Л, на відміну від еритроаглютиніну, здатен розпізнавати три – і тетраантенні β -1-6-N-ацетилглюкозамінні залишки N-гліканів, підвищення експресії яких асоціюється із метастазуванням та прогресією пухлини [7].

Зважаючи на ці дані, можна припустити, що ймовірно, відмінності у біологічній активності сумарного препарату та його ізолектинів є наслідком їхньої різної вуглеводної специфічності та відмінностями глікокоду між різними типами клітин. Вочевидь, вуглеводна специфічність лектинів є ключовим і першим етапом у реалізації його біологічної дії, а саме у визначенні специфічності розпізнавання та зв'язування лектину і клітини-реципієнта. Таке припущення узгоджується із літературними та представленими даними [138], і може пояснювати певні відмінності у біологічній активності лектинів залежно від концентрації та тест-системи.

Варто зауважити, що цитостатична дія та здатність пригнічувати проліферацію клітин була показана і для цілої низки інших лектинів рослинного походження [139]. Варто також згадати і роботи які виконувались у нашому відділі раніше, де із застосуванням клітин ссавців вивчалась дія лектинів рослинного та тваринного походження [5]. При вивченні впливу лектинів насіння сочевиці, лектину ікри окуня та кори бузини чорної також було зареєстровано як мітогенну, так і інгібуючу проліферацію дію останніх залежно від концентрації і типу клітин [138]. Пригнічення проліферації та летальність клітин китайського хом'ячка спостерігались при дії лектинів кори бузини чорної та насіння сочевиці у діапазоні концентрацій від 20 до 2000 мкг/мл.

Цікаво, що у представленій роботі, із застосуванням тієї ж культури клітин як тест-системи, було виявлено пригнічення проліферації клітин лейкоаглютиніном лише у діапазоні концентрацій 100 – 1000 мкг/мл. І як вже зазначалось раніше, із використанням культури клітин раку гортані, усі досліджені нами концентрації лектинів ФГА виявляли пригнічувальну щодо проліферації дію.

Нині панує думка, що лектини, завдяки вуглеводній специфічності здатні зв'язуватись із рецепторами гормонів (наприклад інсуліну), факторів росту, некрозу і у такий спосіб активувати та/або інгібувати різноманітні біологічні процеси у клітині: проліферацію, активацію/пригнічення синтезу ДНК, активацію імунної відповіді, тощо. Зважаючи на це та отримані у роботі дані, можна припустити, що дія лектинів має складний та багатостадійний характер, який певною мірою залежить і від молекулярної будови лектинів та додаткових ензиматичних активностей, як наприклад лектини ікри жаби чи окуня [140]. Стосовно ж лектинів, які не належать до родини RIP білків, або не мають здатності взаємодіяти з нуклеїновими кислотами, як вище згадані лектини тваринного походження, можемо припустити, що їхня дія реалізується опосередковано через взаємодію із

рецепторами та активацію, або пригнічення відповідних сигнальних систем клітини.

Ця думка узгоджується із результатами отриманими із застосуванням мікрокультурального тесту, де було зроблено спробу розрахувати вплив лектинів ФГА на проліферацію, при умові сумарної дії ізолектинів. Отримані результати свідчать на користь припущення, що виявлений вплив сумарного препарату ФГА не є наслідком спільної дії його ізолектинів. Можна припустити, що лейкоаглютинін та еритроаглютинін конкурують за одні й ті ж самі мішені. А різниці у дії лектинів, імовірно за все, пояснюються більш або менш ефективним зв'язуванням лектину із клітиною. І це підтверджує припущення про вплив лектинів саме на рецептори, і у такий спосіб на сигнальні системи і, відповідно, на внутрішньоклітинні процеси.

Отримані дані щодо здатності лектинів ФГА індукувати апоптичні процеси у клітинах були підтверджені також результатами проведеного морфологічного аналізу. При дослідженні реєструвалися типові для апоптозу зміни морфології клітини та ядра після обробки лектинами у концентраціях 1 та 100 мкг/мл (рис 3.7 – 3.15).

Варто зауважити, що при високих концентраціях лектини спричиняли зменшення кількості живих клітин та статистично достовірно підвищували відсоток апоптичних клітин в усіх обраних тест-системах як одразу, так і через 12 годин після обробки (рис. 3.7 – 3.15). Це узгоджується із даними, отриманими за допомогою мікрокультурального тесту. Де, саме за умов високих концентрацій – 100 та 1000 мкг/мл, і сумарний препарат і окремі ізолектини ФГА пригнічували проліферацію клітин ссавців (рис. 3.1 – 3.3).

Як у представленій роботі, так і в дослідженнях інших авторів [138], спостерігались концентраційні залежності інгібуючої проліферацію клітин дії лектинів. Також було зареєстровано типові для апоптозу морфологічні зміни ядра, такі як конденсація та фрагментація хроматину. В літературі наявні й інші дані, що свідчать не лише про властиву сумарному препарату ФГА цитостатичну та цитотоксичну дію в умовах *in vitro* та *in vivo* [131-133], але й

демонструють, що цей лектин зв'язується безпосередньо із мембраною клітини-реципієнта [141-143].

Все вище згадане може переконливо свідчити про те, що лектини, зокрема ФГА, здатні модулювати ті, або інші сигнальні каскади в клітині через взаємодію із відповідними рецепторами на поверхні клітини. Однак, зважаючи на широкий спектр дії лектинів, зокрема їхню мітогенну і цитостатичну/цитотоксичну дію, можна припустити, що механізми впливу лектинів набагато складніші і виходять за рамки моделі вуглевод-білкових взаємодій. Вуглеводна специфічність лектинів обумовлює зв'язування із вуглеводними детермінантами на поверхні клітини, однак було зроблено припущення, що при реалізації їхньої біологічної дії можуть бути залучені і білок-білкові взаємодії.

Тож із застосуванням молекулярного моделювання у роботі було показано, що лейкоаглютинін здатен утворювати специфічні комплекси із рецепторами на поверхні клітинної мембрани, що контролюють проліферацію, ріст та апоптоз. Вперше були отримані моделі комплексів лейкоаглютиніну із рецепторами смерті (FasR і TNF1R) та «анти-апоптичними» рецепторами клітини (IGF1R і EGFR). При цьому, варто зауважити, що білок-білкові комплекси лектину та рецепторів смерті характеризуються більшою енергією зв'язування. І як вже було зазначено, отримана шляхом розрахунків енергія зв'язування для лейкоаглютиніну та EGFR була втричі вищою, ніж для EGFR та специфічних антитіл і становила: – 609,4 kJ/mole проти – 204 та – 147 kJ/mole, відповідно [130].

Це свідчить про високу ймовірність утворення зазначених вище комплексів лейкоаглютиніну та рецепторів у системах *in vitro* та *in vivo*. Незважаючи на те, що представлені біоінформатичні результати не були перевірені безпосередньо у досліді, сам факт, що лейкоаглютинін здатен утворювати високоспецифічні білкові комплекси із рецепторами смерті та антиапоптичними рецепторами клітини, з одного боку узгоджується із

низкою експериментальних даних, а з іншого боку розкриває більш складні механізми реалізації дії лектинів.

Це спонукає дослідників по новому поглянути на вже, здавалось би, досить добре відомі білки – лектини. Вочевидь, при реалізації впливу лектину на проліферацію клітини, або програмовану загибель важливими є і вуглевод-білкові і білок-білкові взаємодії. Це означає, що визначальною, для реалізації такого впливу, буде не лише вуглеводна специфічність лектину, а й його просторова білкова структура. Тобто, лектин здатен утворювати не лише високоспецифічні вуглевод-білкові, а й білок-білкові комплекси і з вуглеводами та білковими рецепторами на поверхні мембрани клітини. Можливо саме це припущення пояснює описані концентраційні залежності дії білків, описані у роботі і іншими авторами, та широкий спектр такої дії: від мітогенної до цитотоксичної.

Можна припустити, що при внесенні лектину у систему клітин, спочатку реалізуються його вуглевод-білкові взаємодії і лектини специфічно розпізнають вуглеводні залишки репрезентовані на поверхні мембрани клітини, які у свою чергу не є сталими і варіюють залежно і від стадії клітинного циклу і від статусу клітин – чи то вона умовно нормальна чи малігнізована. При подальшому насиченні системи лектинами, тобто при збільшенні концентрації, лектини конкурують не лише за вільні вуглеводні детермінанти на мембрані, а й за вільні білкові рецептори репрезентовані там же. І залежно від молекулярної будови самого білка, останні можуть розпізнавати ті чи інші рецептори і відповідно активувати чи пригнічувати певні процеси у клітині.

На користь такого припущення свідчать і роботи іншої групи авторів, які із застосуванням комп'ютерного моделювання показали здатність цілої низки лектинів грибів утворювати білок-білкові комплекси з рецептором TRAIL-R2 із високою енергією зв'язування [144]. Автори припускають, що проаналізовані ними лектини грибів: SSL, FVL, PVL та XCL мають велику перспективу у якості специфічних індукторів апоптозу ракових клітин через

активацію TRAIL-R2 опосередкованого апоптозу. Однак, це припущення потребує подальшої перевірки в експериментах *in vivo* та *in vitro*.

Можна сказати, що лектини, взагалі як група білків, є досить цікавими з точки зору застосування при протипухлинній терапії. У огляді літератури (Розділ 1) досить детально було описано про стратегію активації апоптозу виключно у ракових клітинах, як досить дієву та ефективну тактику. У цьому сенсі вуглеводна специфічність лектинів дає нам змогу підібрати панель білків, які будуть специфічними лише до метастазуючих або малігнізованих клітин, з іншого ж боку здатність лектинів ініціювати апоптоз у клітині вже при мілімолярних концентраціях робить можливим їхнє застосування для ініціації програмованої гибелі у «розпізнаної» групи клітин.

У представленій роботі було перевірено експериментально здатність лектинів ФГА ініціювати апоптоз і вивчено зміни вмісту розщеплених каспаз 3 та 8 після обробки клітин лектинами, а також досліджено зміни експресії генів *Bax* та *Bcl2*. Вдалося показати, що усі три досліджувані нами лектини здатні ініціювати як рецептор-залежний, так і мітохондріальний сигнальний каскади апоптозу у клітинах ссавців. Було встановлено, що еритроаглютинін виявився більш ефективним індуктором як активованих каспаз 3 та 8 так і проапоптичного білка *Bax* у культурі клітин 4BL. У культурі клітин раку гортані людини Нер-2 еритроаглютинін з вищою ефективністю ініціював каспазу 3, тоді як сумарний препарат фітогемаглютиніну – каспазу 8.

Представлені дані узгоджуються із результатами, отриманими із використанням культури клітин раку легень людини, де автори також реєстрували підвищення вмісту розщеплених каспаз 3 та 9 після обробки клітин еритроаглютиніном [8]. У цій роботі також було показано, що еритроаглютинін індукує мітохондріальний сигнальний шлях апоптозу у ракових клітинах лінії А-549. Аналогічно із представленими результатами, автори спостерігали підвищення рівня експресії *Bax*, а також *Bad* та пригнічення експресії *Bcl-2*. Описані результати гарно погоджуються з отриманими в нашій роботі експериментальними даними.

Все це також підтверджується результатами теоретичних розрахунків, проведених іншими авторами [144]. Підвищення вмісту розщеплених каспаз, проапоптичних білків та активація цілих сигнальних каскадів, свідчить на користь існування отриманих у роботі моделей комплексів лейкоаглютиніну та рецепторів – смерті. І на прикладі лейкоаглютиніну можемо висунути припущення, що лектини дійсно, утворюючи білок-білкові комплекси із рецепторами смерті: FasR, TNF1R та TRAIL-R2, здатні ініціювати програмовану загибель клітини, як через активацію рецептор-залежного, так і мітохондріального каскадів (рис. 6.1)

З іншого боку, для лейкоаглютиніну у представленій роботі було показано, що він здатен утворювати комплекси і із «анти-апоптичними» рецепторами: IGF1R та EGFR. З літератури відомо, що дерегуляція сигнальних каскадів EGFR та IGF1R, пригнічення або активація, можуть сприяти туморогенезу включаючи ангиогенез та метастазування та асоціюється із поганим прогнозом для пацієнта [145]. Також відомо, що обидва ці рецептори залучені до активації PI-3K/Akt сигнального шляху у клітині, який у свою чергу підвищує виживання клітин шляхом фосфорилування Bad [128,129]. Зважаючи на результати докінг аналізу, можна припустити, що лейкоаглютинін здатен пригнічувати EGFR та/або IGF1R-1 залежні сигналінги, та таким чином активувати апоптоз (рис. 6.1).

На користь такого припущення свідчать експериментальні дані отримані Куо та колегами, де автори спостерігали пригнічення PI3K/Akt сигналінгу у клітинах раку легень після обробки еритроаглютиніном [8]. Цікаво також, що здатність пригнічувати PI3K/Akt сигналінг та індукувати мітохондріальний апоптоз у клітинах гепатоми людини була показана і для лектину омели корейської [146].

Загалом, аналізуючи власні та літературні дані, можна переконатися у тому, що не лише ФГА, а й інші лектини рослинного та тваринного походження здатні активувати сигнальні каскади програмованої загибелі клітин.

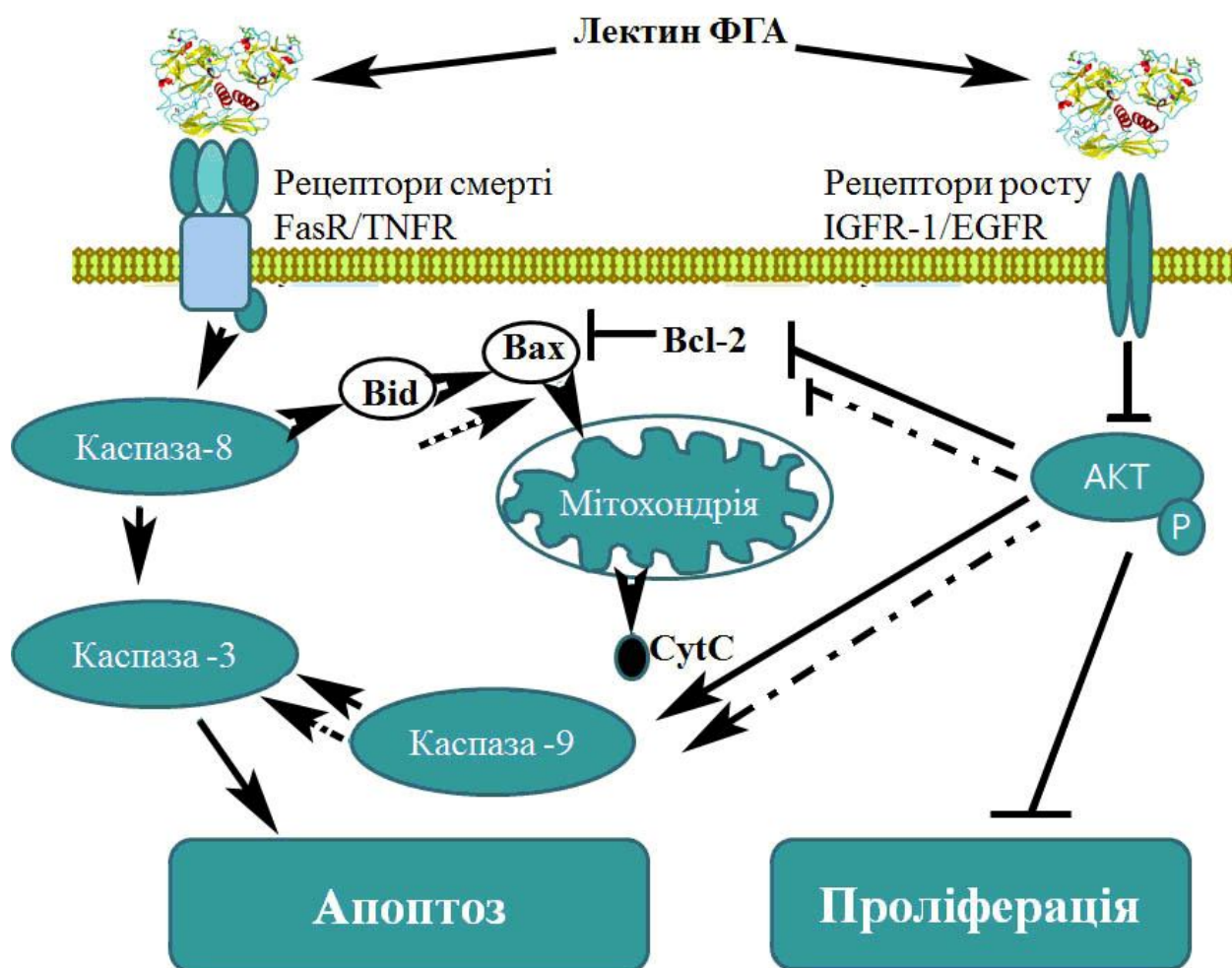


Рис. 6.1. Схематичне узагальнення молекулярних механізмів ініціації апоптозу ФГА. Лектини здатні утворювати білок-білкові комплекси із рецепторами апоптозу та “проліферації” на поверхні клітинної мембрани і у такий спосіб активувати апоптоз. ФГА ініціює підвищення місту активованих каспаз 3 та 8, 9 та модулює вміст про- і антиапоптичних білків, ініціює вихід цитохрому С. Примітки: пунктирна стрілка - власні експериментальні дані, отримані в роботі, штрих-пунктир - літературні дані [8]

Так, для одного із лектинів грибів SRL було показано, що він спричиняє апоптоз клітин раку прямої кишки підвищуючи вміст розщеплених каспаз 3 та 8 та активуючи MAP кіназний сигнально регуляторний шлях [147]. При дослідженні клітин лейкемії людини, було показано, що інший лектин грибів – RBL ініціює рецептор-залежний

механізм апоптозу [148]. Ініціація апоптозу через підвищення вмісту розщеплених каспаз, модуляція рівнів білків Вах та Вак, а також вивільнення цитохрому с у клітинах меланоми була показана і для лектину пшениці WGA [149]. Було показано, що цей лектин здатен спричиняти апоптоз злоякісних клітин через Fas- та каспаза-3 незалежний механізми, а саме - через активацію мітохондріального шляху апоптозу.

Тож, ґрунтуючись на результатах аналізу роботи та літературних даних, можна висунути припущення, що лектини характеризуються більш складними механізмами взаємодії із клітиною-реципієнтом і проявляють, як мітогенну, антиапоптичну, так і проапоптичну активність. Біологічна дія лектинів реалізується, як за рахунок вуглевод-білкових, так і білок-білкових взаємодій, які, власне, і забезпечують специфічне розпізнавання та зв'язування лектину із мембраною клітини та утворення стабільних комплексів із рецепторами смерті (FasR, TNF1R) та «анти-апоптичними» рецепторами. Для розвитку того чи іншого сценарію, тобто ініціації проліферації, або навпаки – апоптозу, важливою є не лише вуглеводна специфічність лектинів, а й репрезентація вуглеводів на поверхні клітинної мембрани та доступність рецепторів, які часто змінюються залежно від стану клітини.

Отже, залежно від стану клітини, концентрації лектину у системі та його молекулярної будови лектини, зокрема ФГА, можуть активувати рецептор-залежний та мітохондріальний шляхи апоптозу, а вибірковість їхнього зв'язування робить їх надзвичайно перспективними з точки зору застосування у протипухлинній терапії.

ВИСНОВКИ

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

1. Встановлено, що ФГА та його окремі 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 і TNF1R), так і антиапоптичними рецепторами (IGF1R and EGFR) клітини.

СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ

1. Wong R.S. Apoptosis in cancer: from pathogenesis to treatment / R.S. Wong // *J. Exp. Clin. Cancer. Res.* –2011. – 30:87. doi: 10.1186/1756-9966-30-87.
2. Kong Q. A threshold concept for cancer therapy / Q. Kong, J.A. Beel, K.O. Lillehei // *Med. Hypotheses.* – 2000. – Vol. 55, N1. – P.29 – 35.
3. Сіальованість глікопротеїнів і рівень експресії NTU1нейрамінідази та сіалілтрансферази ST6GAL1 у лімфоцитах хворих на аритмію / Г.С. Маслак, О.В. Костюк, Д.О. Мінченко [та ін.] // *Фізіол.журн.* – 2014. – Т.60, №5. – С.14 – 22.
4. Сибірна Н.О. Основи глікобіології / Н.О Сибірна, А.І. Шевцова, Г.О. Ушакова [та ін.] – Львів: ЛНУ імені Івана Франка, 2015. – 492с.
5. Пивень О.А. Влияние экзогенных белков на мутационный процесс / О.А. Пивень Л.Л. Лукаш // *Цитология і генетика.* – 2011. – Т.45, N1. – С. 68 – 79.
6. Антонюк В.О. Лектини та їх сировинні джерела / В. О. Антонюк – Л.: Кварт, 2005. – 554 с.
7. Beta1,6-N-acetylglucosamine-bearing N-glycans in human gliomas: implications for a role in regulating invasivity / H. Yamamoto, J. Swoger, S. Greene [et. al] // *Cancer Res.* – 2000. – Vol.60, N1. – P.134– 142.
8. Induction of the mitochondria apoptosis pathway by phytohemagglutinin erythroagglutinating in human lung cancer cells / W.T. Kuo, Y.J. Ho, S.M. Kuo [et. al] // *Ann Surg Oncol.* – 2011. – Vol.18, N3. – P.848 – 856.
9. Animal lectins: potential antitumor therapeutic targets in apoptosis / Z. Liu, Q. Zang, H Peng, W.Z. Zhang // *Appl. Biochem. Biotechnol.* – 2012 . – Vol. 168, N 3. – P. 629 – 637.
10. О.О. Фільченков Апоптоз і рак від теорії до практики / Фільченков О.О., Стойка Р.С. – К.-Тернопіль: Укрмедкнига, 2006. –524с.

11. Renehan A.G. RESPONSE: more about: prospective study of colorectal cancer risk in men and plasma levels of insulin-like growth factor (IGF)-I and IGF-binding protein-3J / A.G. Renehan, S.T. O'Dwyer, S.M. Shalet // Natl Cancer Inst. – 2000. – Vol.92, N23. – P.1949.
12. Остапченко Л.І. Біохімічні механізми апоптозу: навч. Посібник/ Л.І. Остапченко, Т.Б. Синельник, Т.В. Рибальченко, В.К. Рибальченко – К. : ВПЦ «Київський університет», 2010. – 312 с.
13. Льюин Б. Клетки / Б. Льюин – М.: БИНОМ. Лаборатория знаний, 2011. – 952с.
14. Llambi F. Apoptosis and oncogenesis: give and take in the BCL-2 family / F. Llambri, D.R. Green // Curr. Opin. Genet Dev. – 2011. – Vol.2, N1. P.12– 20.
15. Kroemer G. Mitochondrial membrane permeabilisation in cell death / G. Kroemer, L. Galluzzi, C. Brenner // Physiol Rev. – 2007. – Vol.87, N1. – P. 99– 163.
16. Mechanisms of cytochrome c release from mitochondria / C. Garrido, L. Galluzzi, M. Brunet [et al.] // Cell Death Differ. – 2006. – Vol.13, N 9. – P. 1423– 1433.
17. Kim B. Caspase-9 as a therapeutic target for treating cancer / B. Kim, S. K. Srivastava, S. H. Kim // Expert Opin Ther Targets. – 2015. – Vol.19, N1. – P.113– 127.
18. AIF-mediated programmed necrosis: a highly regulated way to die / H. Boujrad, O.Gubkina, N. Robert [et al.] // Cell Cycle. – 2007. – Vol.6, N 21. – P. 2612–2619.
19. IAP-targeted therapies for cancer / E.C. LaCasse, D.J. Mahoney, H.H. Cheung [et al.] // Oncogene. – 2008. – Vol. 27, N48. – P.6252 – 6275.
20. Elmore S. Apoptosis: A Review of Programmed Cell Death / S. Elmore // Toxicol Pathol. – 2007. – Vol.35, N4. – P.495 – 516.

21. Programmed cell death pathways in cancer: a review of apoptosis, autophagy and programmed necrosis / L. Ouyang, Z. Shi, S. Zhao [et al.] // *Cell Prolif.* – 2012. – Vol.45, N6. – P.487 – 498.

22. Distinct lipid effects on tBid and Bim activation of membrane permeabilization by pro-apoptotic Bax / A. Shamas-Din, S. Binder, X. Chi [et al.] // *Biochem J.* – 2015. – Vol.467, N3. – P.495 – 505.

23. Knuesel I. Reelin-mediated signaling in neuropsychiatric and neurodegenerative diseases / I. Knuesel // *Prog Neurobiol.* – 2010. – Vol.91, N4. – P. 257 – 274.

24. Apoptosis in cancer: key molecular signaling pathways and therapy targets / C. Burz, I. Berindan-Neagoe, O. Balacescu, A. Irimie // *Acta Oncol.* – 2009. – Vol.48, N6. – P.811–821.

25. Programmed cell death pathways and current antitumor targets / M.L. Tan, J.P. Ooi, N. Ismail [et al.] // *Pharm. Res.* – 2009. – Vol.26, N7. – P.1547 – 1560.

26. A phase I safety and pharmacokinetics study of recombinant Apo2L/TRAIL an apoptosis inducing protein in patients with advanced cancer / R.S. Herbst, D.S. Mendolson, S. Ebbinghaus [et al.] // *J Clin Oncol.* – 2006. – Vol. 24, suppl.18. – P.3013.

27. A phase I study of CS-1008 (humanized monoclonal antibody targeting death receptor 5 or DR5) administered weekly to patients with advanced solid tumors or lymphomas / M.N. Saleh, I. Percent, T.E. Wood [et al.] // *J Clin Oncol.* – 2008. – Vol.26, suppl.15. – P.3537.

28. Bai L. p53: structure, function and therapeutic applications / L. Bai, W.G. Zhu // *J. Cancer. Mol.* – 2006. – Vol.2, N4. – P.141– 153.

29. Retrovirus-mediated wild-type p53 gene transfer to tumors of patients with lung cancer / J.A. Roth, D. Nguyen, D.D. Lawrence [et al.] // *Nat. Med.* – 1996. – Vol.2, N9. – P. 985 – 991.

30. Selective replication and oncolysis in p53 mutant tumors with ONYX-015, an E1B-55kD gene-deleted adenovirus, in patients with advanced head and neck cancer: A phase II trial / J. Nemunaitis, I. Ganly, F. Khuri [et al.] // *Cancer Res.* – 2000. – Vol.60, N22. – P.6359–6366.

31. Vermeij R. Immunological and clinical effects of vaccines targeting p53-overexpressing malignancies / R. Vermeij, N. Leffers, S.H. Van der Burg // *J Biomed Biotechnol.* – 2011. – 702146. doi: 10.1155/2011/702146.

32. Targeted rescue of a destabilised mutant of p53 by an in silico screened drug / F.M. Boeckler, A.C. Joerger, G. Jaggi [et al.] // *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* – 2008. – Vol.105, N30. – P.10360 – 10365.

33. Characterisation of the p53-rescue drug CP-31398 in vitro and in living cells / T. M. Pippin, V. J. Bykov, S. M. Selivanova [et al.] // *Oncogene.* – 2002. – Vol.21, N14. – P.2119 – 2129.

34. Shangary S. Small-molecule inhibitors of the MDM2-p53 protein-protein interaction to reactivate p53 function: a novel approach for cancer therapy / S. Shangary, S. Wang // *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* – 2009. – Vol.49. – P. 223 – 241.

35. Kang M. H. Targeting mitochondrial apoptotic pathways in cancer therapy / M. H. Kang, C.P. Reynolds // *Clin. Cancer. Res.* – 2009. – Vol.15, N4. – P.1126 – 1132.

36. Kirkin V. The role of Bcl-2 family members in tumorigenesis / V. Kirkin, S. Joos, M. Zornig // *Biochim. Biophys. Acta.* – 2004. – Vol.1644. – P. 229–249.

37. An inhibitor of Bcl-2 family proteins induces regression of solid tumours / T. Oltersdorf, S.W. Elmore, A. R. Shoemaker [et al.] // *Nature.* – 2005. – Vol.435, N7042. – P.677–681.

38. Multiple BH3 mimetics antagonize antiapoptotic MCL1 protein by inducing the endoplasmic reticulum stress response and upregulating BH3-only

protein NOXA / T.C. Albershardt, B. L. Salerni, R.S. Soderquist [et al.] // *J. Biol. Chem.* –2011. – Vol.286, N28. – P.24882–24895.

39. Variants of bcl-2 specific siRNA for silencing antiapoptotic bcl-2 in pancreatic cancer / M. Ocker, D. Neureiter, M. Lueders [et al.] // *Gut.* – 2005. – Vol.59, N9. – P. 1298–1308.

40. Silencing of Bmi-1 gene by RNA interference enhances sensitivity to doxorubicin in breast cancer cells / X. Wu, X. Liu, J. Sengupta [et al.] // *Indian J. Exp. Biol.* – 2001. –Vol.49, N2. – P.105 – 112.

41. Modica- Napolitano J.S. Treatment strategies that enhance the efficacy and selectivity of mitochondria-targeted anticancer agents / J.S. Modica-Napolitano, V. Weissig // *Int. J. Mol. Sci.* –2015. – Vol.16, N8. – P. 17394–17421.

42. Kong Q. A threshold concept for cancer therapy / Q. Kong, J.A. Beel, K.O. Lillehei // *Med. Hypotheses.* – 2000. – Vol.55, N1. – P.29–35.

43. Antisense oligonucleotides targeting XIAP induce apoptosis and enhance chemotherapeutic activity against human lung cancer cells in vitro and in vivo / Y. Hu, G. Cherton-Horvat, V. Dragowska [et al.] // *Clin. Cancer. Res.* – 2003. –Vol.9 –P.2826–2836.

44. siRNA targeting NBS1 or XIAP increases radiation sensitivity of human cancer cells independent of TP53 status / K. Ohnishi, Z. Scuric, R. H. Schiesti [et al.] // *Radiat. Res.* –2006. – Vol.166. – P.454–462.

45. Targeting of X-linked inhibitor of apoptosis protein or Survivin by short interfering RNAs sensitises hepatoma cells to TNF-related apoptosis-inducing ligand- and chemotherapeutic agent-induced cell death / Y. Yamaguchi, K. Shiraki, H. Fuke [et al.] // *Oncol Rep.* – 2005. – Vol.12. –P.1211– 1316.

46. Pennati M. Targeting Survivin in cancer therapy: fulfilled promises and open questions / M. Pennati, M. Folini, N. Zaffaroni // *Carcinogenesis.* – 2007. – Vol.28, N6. – P.1133–1139.

47. Designing Smac-mimetics as antagonists of XIAP, cIAP1, and cIAP2 / F. Cossu, E. Mastrangelo, M. Milani [et al.] // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* – 2009. – Vol.378. – P.162–167.

48. Fandy T. E. Smac/DIABLO enhances the therapeutic potential of chemotherapeutic drugs and irradiation, and sensitizes TRAIL-resistant breast cancer cells / T. E. Fandy, S. Shankar, R. K. Srivastava // *Mol Cancer.* – 2008. – doi: 10.1186/1476-4598-7-60.

49. Rohn J. L. The viral death effector Apoptin reveals tumourspecific processes / J. L. Rohn, M. H. Notelbladt // *Apoptosis.* – 2004. – Vol.9. – P.315–322.

50. Caspases and cancer: mechanisms of inactivation and new treatment modalities / A. Philchenkov, M. Zavelevich, T. J. Krocak [et al.] // *Exp. Oncol.* – 2004. – Vol.26, N2. – P.82–97.

51. Cancer gene therapy using a pro-apoptotic gene, caspase-3 / K. Yamabe, S. Shimizu, T. Ito // *Gene Ther.* – 1999. – Vol.6, N12. – P.1952–1959.

52. Gene transfer of constitutively active caspase-3 induces apoptosis in a human hepatoma cell line / L. Cam, A Boucquey, A. Coulomb- L'hermine [et al.] // *Gene Med.* – 2005. – Vol.7, N1. – P.30 – 38.

53. Inhibitory effect of recombinant adenovirus carrying immunocaspase-3 on hepatocellular carcinoma / X. Li, R. Fan, X. Zou [et al.] // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* – 2007. – Vol.358, N2. – P.489 – 494.

54. MicroRNAs as regulators of apoptosis mechanisms in cancer / V. Pileczki, R. Cojocneanu-Petric, M. Maralani [et al.] // *Clujul. Med.* – 2016. – Vol.89, N1.– P.50–55.

55. Sharon N. History of lectins: from hemagglutinins to biological recognition molecules / N. Sharon, H. Lis // *Glycobiology.* – 2004. – Vol.14, N 11. – P.53 – 62.

56. Identification of microRNA-regulated autophagic pathways in plant lectin-induced cancer cell death / L. L. Fu, X. Zhao, H. L. Xu [et al.] // *Cell Prolif.* – 2012. – Vol.45, N5. – P.477 – 485.

57. Lectins with potential for anti-cancer therapy / T. Yau, X. Dan, C.C Ng [et al.] // *Molecules.* – 2015. –Vol.20, N3. – P.3791 – 3810.

58. Identification of GlcNAcylated alpha-1-antichymotrypsin as an early biomarker in human non-small-cell lung cancer by quantitative proteomic analysis with two lectins / Y. Jin, J. Wang, X. Ye [et al.] // *Br. J. Cancer.* – 2016. – Vol.114, N5. – P.532 – 544.

59. Lei H. Y. Induction of autophagy by concanavalin A and its application in anti-tumor therapy / H.Y. Lei, C.P. Chang // *Autophagy.* – 2007. – Vol.3, N4. – P.402– 404.

60. *Polygonatum odoratum* lectin induces apoptosis and autophagy via targeting EGFR-mediated Ras-Raf-MEK-ERK pathway in human MCF-7 breast cancer cells / L. Ouyang, Y. Chen, X.Y. Wang [et al.] // *Phytomedicine.* – 2014. – Vol.21, N12. – P. 1658 – 1665.

61. Structural basis for the carbohydrate recognition of the *Sclerotium rolfsii* lectin / D.D. Leonidas, B.M. Swamy, G.N. Hatzopoulos [et al.] // *J. Mol. Biol.* – 2007. – Vol.368, N4. – P.1145 – 1161.

62. *Sclerotium rolfsii* lectin induces stronger inhibition of proliferation in human breast cancer cells than normal human mammary epithelial cells by induction of cell apoptosis / M. A. Savanur, S. M. Eligar, R. Pujari [et al.] // *PLoS One.* – 2014. – Vol.9, N11. – P. e110107. doi:10.1371/journal.pone.0110107

63. Wu L. Anti-tumor and anti-viral activities of *Galanthus nivalis* agglutinin (GNA)-related lectins / L. Wu, J. K. Bao // *Glycoconj. J.* –2013. – Vol.30, N3. – P.269 – 279.

64. Molecular switch role of Akt in *Polygonatum odoratum* lectin-induced apoptosis and autophagy in human non-small cell lung cancer A549 cells / C. Li, J.

Chen, B. Lu [et al.] // PLoS One. – 2014, Vol.9. – P.e101526. doi: 10.1371/journal.pone.0101526.

65. Induction of apoptosis by Polygonatum odoratum lectin and its molecular mechanisms in murine fibrosarcoma L929 cells / B. Liu, B. Zhang, M. W. Min [et al.] // Biochim . Biophys. Acta. – 2009. – Vol.1790, N8. – P. 840 – 844.

66. Lyu S.Y. Effects of Korean mistletoe lectin (*Viscum album coloratum*) on proliferation and cytokine expression in human peripheral blood mononuclear cells and T-lymphocytes / S.Y. Lyu, W.B. Park // Arch. Pharm. Res. – 2007. – Vol.30, N10. – P.1252– 1264.

67. Fermented mistletoe extract as a multimodal antitumoral agent in gliomas / O. Podlech, P.N. Harter, M. Mittelbronn [et al.] // Evid Based Complement Altern. Med. – 2012. – doi: 10.1155/2012/501796.

68. Ostermann T. Survival of cancer patients treated with mistletoe extract (Iscador): a systematic literature review / T. Ostermann, C. Raak, A Bussing // BMC Cancer. – 2009. – Vol.9. – P.451.

69. Kirsch A. Successful treatment of metastatic malignant melanoma with *Viscum album* extract (Iscador M) / A. Kirsch // J. Altern. Complement. Med. – 2007. – Vol.13, N4. – P.443 – 445.

70. Hong C.E. Synergistic anticancer effects of lectin and doxorubicin in breast cancer cells / C.E. Hong, A.K. Park, S.Y. Lyu // Mol. Cell. Biochem. –2014. – Vol.394, N1-2. –P.225–235.

71. Lyu S.Y. Korean mistletoe lectin-induced apoptosis in hepatocarcinoma cells is associated with inhibition of telomerase via mitochondrial controlled pathway independent of p53 / S.Y Lyu, S.H Choi, W. B. Park // Arch. Pharmacol. Res. – 2002. –Vol.25, N1. P.93– 101.

72. Molecular mechanisms of mistletoe plant extract-induced apoptosis in acute lymphoblastic leukemia *in vivo* and *in vitro* / G. Seifert, P. Jesse, A. Laengler [et al.] // *Cancer Lett.* –2008. –Vol.264, N2. – P.218–228.

73. The preclinical and clinical activity of aviscumine: A potential anticancer drug / H. Zwierzina, L. Bergmann, H. Fiebig [et al.] // *Eur. J. Cancer.* – 2011. – Vol.47, N10. – P.1450 – 1457.

74. Schumacher U. Recombinant mistletoe lectin (rML) is successful in treating human ovarian cancer cells transplanted into severe combined immunodeficient (SCID) mice / U. Schumacher, S. Feldhaus, U. Mengs // *Cancer Lett.* – 2000. – Vol.150, N2. P.171–175.

75. Liu B. Induction of apoptosis by Concanavalin A and its molecular mechanisms in cancer cells / B Liu, M.W. Min, J. K. Bao // *Autophagy.* – 2009. – Vol.5, N3. – P.432–433.

76. Pratt J. Concanavalin-A-induced autophagy biomarkers requires membrane type-1 matrix metalloproteinase intracellular signaling in glioblastoma cells / J. Pratt, R. Roy, B. Annabi // *Glycobiology.* – 2012. – Vol.22, N9. – P. 1245– 1255.

77. Role of PI3K/Akt/mTOR and MEK/ERK pathway in Concanavalin A induced autophagy in HeLa cells / B. Roy, A.K. Pattanaik, J. Das [et al.] // *Chem Biol Interact.* –2014. –Vol.210. – P.96 –102.

78. Concanavalin A from an old protein to novel candidate anti-neoplastic drug / C.Y. Li, H.L. Xu, B Liu [et al.] // *Curr. Mol. Pharmacol.* –2010. – Vol.3, N3. – P.123 – 128.

79. Chang C.P. Autophagy induction in T cell-independent acute hepatitis induced by concanavalin A in SCID/NOD mice / C. P. Chang, H.Y. Lei // *Int. J. Immunopathol. Pharmacol.* – 2008. – Vol.21, N4. – P.812–826.

80. Immune mechanisms of Concanavalin A model of autoimmune hepatitis. / H.X. Wang, M. Liu, S.Y. Weng [et al.] // *World J Gastroenterol.* –2012. –Vol.18, N 2. – P.119 – 125.

81. Causse H. Lectin release from imbibed soybean seed nad its possible function / H. Causse, P. Rouge // *Lectins: Biol Biochem., Clin Biochem.* – 1983. – Vol.3. – P.559– 572.

82. Anti-nutritional effects of a moderate dose of soybean agglutinin in the rat / Z.Li, D. Li, S. Qiao [et al.] // *Arch Tierernahr.* – 2003. – Vol.57, N4. – P.267 – 277.

83. Effects of lectins with different carbohydrate-binding specificities on hepatoma, choriocarcinoma, melanoma and osteosarcoma cell lines / H. Wang, T.B. Ng, V.E. Ooi [et al.] // *Int. J. Biochem. Cell Biol.* – 2000. – Vol.32, N3. – P.365 – 372.

84. Bakalova R. Interaction of soybean agglutinin with leukemic T-cells and its use for their in vitro separation from normal lymphocytes by lectin-affinity chromatography / R. Bakalova, H. Ohba // *Biomed Chromatogr.* – 2003. – Vol.17, N4. – P.239–249.

85. Antitumor effect of soybean lectin mediated through reactive oxygen species-dependent pathway / P.K. Panda, S. Mukhopadhyay, B. Behera [et al.] // *Life Sci.* – 2014. – Vol.111, N1-2. – P.27–35.

86. Conformational study reveals amino acid residues essential for hemagglutinating and anti-proliferative activities of Clematis montana lectin / B.Lu, B. Zhang, W. Qi [et al.] // *Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai).* – 2014. – Vol.46. N11. – P.923-934.

87. Clematis montana lectin, a novel mannose-binding lectin from traditional Chinese medicine with antiviral and apoptosis-inducing activities / H. Peng, H. Lv, Y. Wang [et. al.] // *Peptides.* – 2009. –Vol.30, N10. – P.1805–1815.

88. Recombinations of subunits of *Phaseolus vulgaris* isolectins / R. L. Felsted, M. J. Egorin, R. D. Leavitt [et al.] // *J Biol Chem.* – 1977. – Vol.252, N9. – P.2967– 2671.

89. The crystallographic structure of phytohemagglutinin-L / T.W. Hamelryck, M.H. Dao-Thi, F. Poortmans [et al.] // *J Biol Chem.* – 1996. –Vol.271, N34. – P.20479 – 20485.

90. Biswas S. Thermal stability of *Phaseolus vulgaris* leucoagglutinin: a differential scanning calorimetry study / S. Biswas, A.M. Kayastha // *J Biochem Mol Biol.* – 2002. – Vol.35, N5. – P.472 – 475.

91. Dupuis G. Impairment by covalent modification of the ability of *Phaseolus vulgaris* phytohemagglutinin to stimulate cultured human lymphocytes: a comparison of different forms of covalent modification / G Dupuis, S.Claïroux-Moreau, P. Chevrier // *Can J. Biochem.* – 1980. – Vol.58, N2. – P.137 – 142.

92. Chunhua R. Essentials of mesenchymal stem cell biology and its clinical translation / R.Chunhua, R.C. Zhao – Berlin, Germany: Springer, 2013. – 321 p.

93. Pusztai A. The nutritional toxicity of *Phaseolus vulgaris* lectins/ A. Pusztai, E.M. Clarke, T.P King // *Proc Nutr Soc.* – 1979. – Vol.38, N1. – P.115– 120.

94. Phytohaemagglutinin inhibits gastric acid but not pepsin secretion in conscious rats / K. Kordak, G. Szalmay, S. Bardocz [et al.] // *J Physiol Paris.* – 2001. – Vol.95, N1-6. – P.309–314.

95. The effect of phytohemagglutinin at different dietary concentrations on the growth, body composition and plasma insulin of the rat / S. Bardocz, G. Grant, A. Pusztai // *Br J Nutr.* –1996. – Vol.76, N4. –P.613–626.

96. The effects of *Phaseolus vulgaris* erythro- and leucoagglutinating isolectins (PHA-E and PHA-L) delivered via artificial diet and transgenic plants on the growth and development of tomato moth (*Lacanobia oleracea*) larvae; lectin

binding to gut glycoproteins in vitro and in vivo / E. Fitches, C. Piet, Gatehouse [et al.] // *J Insect Physiol.* – 2001. – Vol.47, N12. – P.1389–1398.

97. Phytohemagglutinins augment red kidney bean (*Phaseolus vulgaris* L.) induced allergic manifestations / S. Kumar, A.K. Verma, A. Sharma [et al.] // *J Proteomics.* – 2013. – Vol.93. – P.50 – 64.

98. К механизму действия фитогемагглютинаина как стимулятора заживления ран / И.Н. Большаков, И.А. Поберий, Д.П. Линдер [и др.] // *Архив патологии.* – 1980. – Т.42, №5. – С. 26 – 32.

99. Саркисян Ю.Х. Применение фитогемагглютинаина (ФГА) в комплексном лечении лучевых поражений кожи / Ю.Х. Саркисян, В.И. Попов // *Медицинская радиология.* – 1972. – Т.7. – С.7 – 10.

100. Стовбуровий потенціал нової лінії клітин людини 4BL / В.О. Кушнірук, В.А. Шаблій, С.П. Шпильова [та ін.] // *Вісн. Укр. тов-ва генетиків і селекціонерів.* – 2016. – Т.14, № 1. – С. 27-35.

101. Extensive homology between the subunits of the phytohemagglutinin mitogenic protein derived from *Phaseolus vulgaris* / I.B. Miller R. Hsu, R. Henrikson [et al.] // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* – 1975. –Vol.72, N4. – P.1388 – 1391.

102. In vitro influence of lectins and neoglycoconjugates on the growth of three human sarcoma cell lines / M. Remmelink , F. Darro, C. Decaestecker [et al.] // *J Cancer Res Clin Oncol.* – 1999. – Vol.125, N5. – P.275–285.

103. In vitro characterization of lectin-induced alterations on the proliferative activity of three human melanoma cell lines / P. Lorea, D. Goldschmidt, F. Darro [et al.] // *Melanoma Res.* – 1997. – Vol.7, N5. – P. 353 – 363.

104. Continuous antibody production by phytohemagglutinin-L-aggregated hybridoma cells / H. Takamatsu, H. Kawajiri, Y. Takahashi // *J Immunol Methods.* – 1999. – Vol.223, N2. – P.165 – 170.

105. Оценки цитотоксичности препаратов с антиканцерогенным действием в культурах клеток человека / Л.Л. Лукаш, Е.Б. Патон, Е.М. Сухорада [и др.] // Цитология и генетика. – 1997. – Т.31, № 6. – С.26 – 34.

106. The end of the (cell) line: methods for the study of apoptosis in vitro// Methods in cell biology / A.J. McGanon, S.J. Martin, R.P. Bissonnette [et al.] // Ed. Schwartz L.M., Osborne B.A. Acad. Pres Inc “Cell Death”. – 1995. – Vol.46. – P172– 173.

107. Селиванов Е.В. Красители в биологии и медицине / Е.В. Селиванов – Барнаул : Азбука, 2003. – 40 с.

108. Minchenko O.H. The role of the TNF receptors and apoptosis inducing ligands in tumor growth / O.H. Minchenko, D.O. Tsymbal, D.O. Minchenko, O.O. Ratushna // Ukr.Biochem.J. –2016. –Vol.88, N4. – P.18 – 37.

109. Scalable molecular dynamics with NAMD / J. Phillips, R. Braun, W. Wang [et al.] // J Comput Chem. – 2005. – Vol.26, N16. – P.1781 – 1802.

110. CHARMM: the biomolecular simulation program / B. Brooks, C. Brooks, A.D. Mackerell [et al.] // J Comput Chem. – 2009. – Vol. 30, N10. – P.1545 – 1614.

111. Detailed comparison of the protein-ligand docking efficiencies of GOLD, a commercial package and ArgusLab, a licensable freeware / S. Joy, P.S. Nair, R. Hariharan [et al.] // In Silico Biol. – 2006. – Vol.6, N6. – P.601 – 605.

112. Ramakrishnan C. Stereochemical criteria for polypeptide and protein chain conformations. II. Allowed conformations for a pair of peptide units / C. Ramakrishnan, G. N.Ramachandran // Biophys J. –1965. – Vol.5, N6. – P.909– 933.

113. Маниатис Т. Методы генетической инженерии Молекулярное клонирование. / Т. Маниатис, Э. Фриз, Д. Сэмбрук – М.:Мир, 1984. – 425с.

114. Morten E.N. Increased O6-alkylguanine DNA alkyltransferase activity in chinese hamster V-79 cell following selection with chloroethylating agents / E.N. Morten, G.P. Margison // *Carcinogenesis*. – 1988. – Vol.9, N1. – P.45 – 49.

115. Bradford M.M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding / M. M. Bradford // *Anal Biochem*. – 1976. – Vol.72. – P.248 – 254.

116. Laemmli U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4 / U.K. Laemmli // *Nature*. – 1970. – Vol.227, N5259. – P.680 – 685.

117. Peumans W., Hao Q., Van Damm E. Ribosome-inactivating proteins from plants: more than RNA N-glycosidases? / W. Peumans, Q. Hao, E. Van Damm // *The FASEB Journal*. – 2001. – Vol.15, N9. – P.1493 – 506.

118. Roos W. Apoptosis triggered by DNA damage O6-methylguanine in human lymphocytes requires DNA replication and is mediated by p53 and Fas/CD95/Apo-1 / W. Roos, M. Baumgarther, B. Kaina // *Oncogene*. – 2004. – Vol.23, N23. – P.359 – 367.

119. Dunkern D. Apoptosis induced by MNNG in human TK6 lymphoblastoid cells is p53 and Fas/CD95/Apo-1 related / D. Dunkern, W. Roos, B. Kaina // *Mutat Res*. – 2003. – Vol.544, N2-3. – P.167 – 172.

120. Steroid receptor coactivator-interacting protein (SIP) inhibits caspase-independent apoptosis by preventing apoptosis-inducing factor (AIF) from being released from mitochondria/ D. Wang, J. Liang, Y. Zhang [et al.] // *J Biol Chem*. – 2012. – Vol.287, N16. – P.12612 – 12621.

121. Съякте Т.Г. Химические соединения, повреждающие ДНК / Т.Г. Съякте, Я.Я. Съякте – Рига: Зинатне, 1991. – 152 с.

122. The crystallographic structure of phytohemagglutinin-L / T.W. Hamelryck, M.H. Dao-Thi, F. Poortmans [et al.] // *J Biol Chem*. – 1996. – Vol.271, N34. – P.20479– 20485.

123. Carter P.H. Photochemically enhanced binding of small molecules to the tumor necrosis factor receptor-1 inhibits the binding of TNF-alpha / P.H. Carter, P.A. Scherle, J.K. Muckelbauer [et al.] // Proc.Natl.Acad.Sci.USA. – 2001. – Vol.98. – P.11879 – 11884.

124. Ritchie D.W. Ultra-Fast FFT Protein Docking On Graphics / D.W. Ritchie, V. Venkatraman // Processors. Bioinformatics. – 2010. – Vol.26. – P.2398– 2405.

125. Sampognaro A.J. Proline isosteres in a series of 2,4-disubstituted pyrrolo[1,2-f][1,2,4]triazine inhibitors of IGF-1R kinase and IR kinase / A.J. Sampognaro, M.D. Wittman, J.M. Carboni [et al.] // Bioorg.Med.Chem.Lett. – 2010. – Vol.20. – P.5027–5030.

126. Chodorge M. A series of Fas receptor agonist antibodies that demonstrate an inverse correlation between affinity and potency / M. Chodorge, S. Züger, C. Stirnimann [et al.] // Cell Death Differ. – 2012. – Vol.19. – P.1187–1195.

127. Liu P. A single ligand is sufficient to activate EGFR dimmers / P. Liu, T.E. Cleveland, S. Bouyain [et al.] // Proc.Natl.Acad.Sci.USA. – 2012. – Vol.109. –P.10861– 10866.

128. Wieduwitt M.J. The epidermal growth factor receptor family: biology driving targeted therapeutics / M.J. Wieduwilt, M.M. Moasser // Cell Mol Life Sci. – 2008. – Vol.65, N10. –P.1566 – 1584.

129. Tagoug I. Inhibition of IGF-1 signalling enhances the apoptotic effect of AS602868, an IKK2 inhibitor, in multiple myeloma cell lines / I. Tagoug, A. Sauty De Chalon, C. Dumontet // PLoS One. – 2011. – Vol.6, N7. – P. e22641.

130. Epiregulin Recognition Mechanisms by Anti-epiregulin Antibody 9E5: Structural, functional, and molecular dynamics simulation analyses / Y. Kado, E. Mizohata, S. Nagatoishi [et al.] // J Biol Chem. – 2016. – Vol.291, N5. – P.2319 – 2330.

131. Remmelink M. In vitro influence of lectins and neoglycoconjugates on the growth of three human sarcoma cell lines/M. Remmelink, F. Darro, C. Decaestecker [et al.] // *J Cancer Res Clin Oncol.* – 1999. – Vol.125. – P.275 – 285.

132. Lorea P. In vitro characterization of lectin-induced alterations on the proliferative activity of three human melanoma cell lines / P. Lorea, D. Goldschmidt, F. Darro [et al.] // *Melanoma Res.* – 1997. – Vol.7. – P.353 – 363.

133. Takamatsu H. Continuous antibody production by phytohemagglutinin-L-aggregated hybridoma cells / H. Takamatsu, H. Kawajiri, Y. Takahashi [et al.] // *J Immunol Methods.* – 1999. – Vol.223. – P.165 – 170.

134. Pryme I.F. Dietary mistletoe lectin supplementation and reduced growth of a murine non-Hodgkin lymphoma / I.F. Pryme, S. Bardocz, A. Pusztai [et al.] // *Histol Histopathol.* – 2002. – Vol.17. – P.261 – 271.

135. Antitumoral effects of an intravesically applied aqueous mistletoe extract on urinary bladder carcinoma MB49 in mice/ Mengs U, Schwarz T, Bulitta M [et al.] // *Anticancer Res.* – 2000. – Vol.20. – P.3565 – 3568.

136. Park W.B. Inhibition of tumor growth and metastasis by Korean mistletoe lectin is associated with apoptosis and antiangiogenesis / W.B. Park, S.Y. Lyu, J.H. Kim [et al.] // *Cancer Biother Radiopharm.* – 2001. – Vol.16. – P.439 – 447.

137. Thies A. Low-dose mistletoe lectin-I reduces melanoma growth and spread in a scid mouse xenograft model/ A. Thies, P. Dautel, A. Meyer [et al.] // *British Journal of Cancer.* – 2008. – Vol.98, N1. – P.106 – 112.

138. Коваленко О.О. Дослідження цитотоксичної дії рослинних та тваринних лектинів з різною вуглеводною специфічністю / О.О. Коваленко, Л.Л. Лукаш // *Фактори експериментальної еволюції організмів: [зб. наук. пр.]* – К: ЛОГОС. – 2006. – Т.3. – 436 с.

139. Giacometti J. Plant lectins in cancer prevention and treatment / J. Giacometti // *Medicina fluminensis.* – 2015 – Vol.51, N2. – P.211 – 229.

140. Tatsuta T. Sialic acid-binding lectin (lectzyme) induces caspase-dependent apoptosis-mediated mitochondrial perturbation in Jurkat cells / T. Tatsuta, M. Hosono, S. Sugavara [et al] // Int J Oncol. –2013. – Vol.43, N5. – P.1402 – 1412.

141. Suzuki O. *Phaseolus vulgaris* leukoagglutinating lectin-binding reactivity in human diffuse large B cell lymphoma and its relevance to the patient's clinical outcome: Lectin histochemistry and lectin blot analysis / O.Suzuki, Y. Nozawa, T. Kawaguchi [et al.] // Pathol Int. – 1999. – Vol.49. – P.874 – 880.

142. Cochran A. J. Cytoplasmic accumulation of peanut agglutinin-binding glycoconjugates in the cells of primary melanoma correlates with clinical outcome / A.J. Cochran, D.R. Wen, O. Berthier-Vergnes [et al.] // Hum Pathol. – 1999. – Vol.30. – P.556 – 561.

143. Mitchell B.S. Do HPA and PHA-L have the same binding pattern in metastasizing human breast and colon cancers? / B.S. Mitchell, S.A. Brooks, A.J. Leathem [et al.] // Cancer Lett. – 1998. – Vol.123. – P.113– 119.

144. Arumugam S. Docking studies on fungal lectin for inducing tumor necrosis factor related apoptosis inducing ligand-receptor 2 (TRAIL-R2): Using Hex / S. Arumugam, K. Murugiyar // Euro. J. Exp. Bio. – 2013.– Vol.3, N5. – P.258 – 261.

145. Scaltriti M. The epidermal growth factor receptor pathway: a model for targeted therapy / M. Scaltriti, J. Baselga // Clin Cancer Res. – 2006. – Vol.12, N18. – P.5268 – 5272.

146. Choi S.H. Mistletoe lectin induces apoptosis and telomerase inhibition in human A253 cancer cells through dephosphorylation of Akt / S.H. Choi, S.Y. Lyu, W.B. Park // Arch Pharm Res. – 2004. – Vol.27, N1. – P. 68 – 76.

147. SRL lectin induced apoptosis of human colon cancer cells: identification of pathways leading to cell death / N. Guha, S.A. Deepak , S. Barkeer [et al.] // The FASEB Journal. – 2014. – Vol.28, suppl.589.1.

148. Rhizoctonia Bataticola Lectin (RBL) Induces Caspase-8-Mediated Apoptosis in Human T-Cell Leukemia Cell Lines but Not in Normal CD3 and CD34 Positive Cells / R. Pujari, S.M. Eligar, N. Kumar [et al.] // PLOSOne. – 2013. – <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0079311>

149. A novel apoptotic pathway as defined by lectin cellular initiation / B. Gastman, K.Wang, J. Han [et al.] // Biochem Biophys Res Commun. – 2004. – Vol.316, N1. – P.263 – 271.

Додаток А

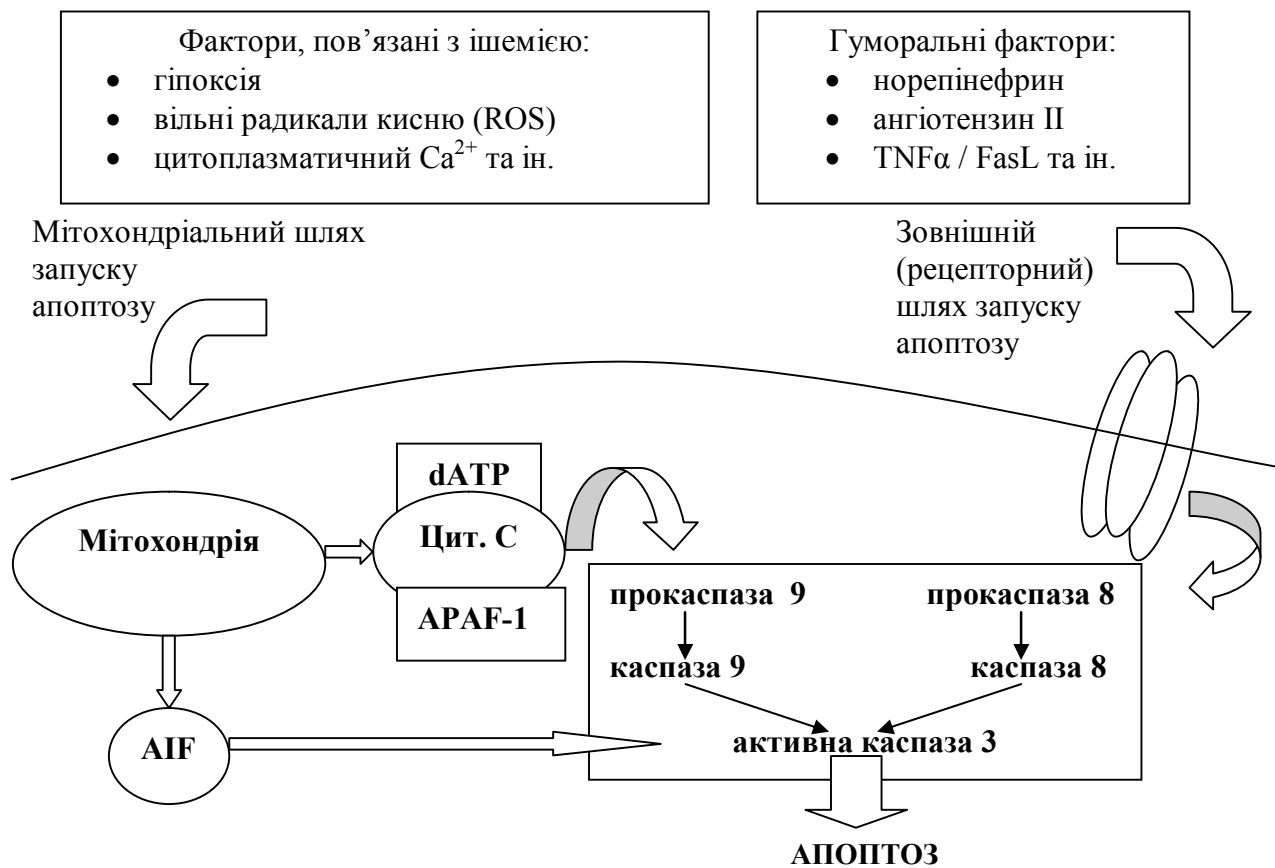


Рис 1. Схематичне зображення основних шляхів активації апоптозу

Додаток Б

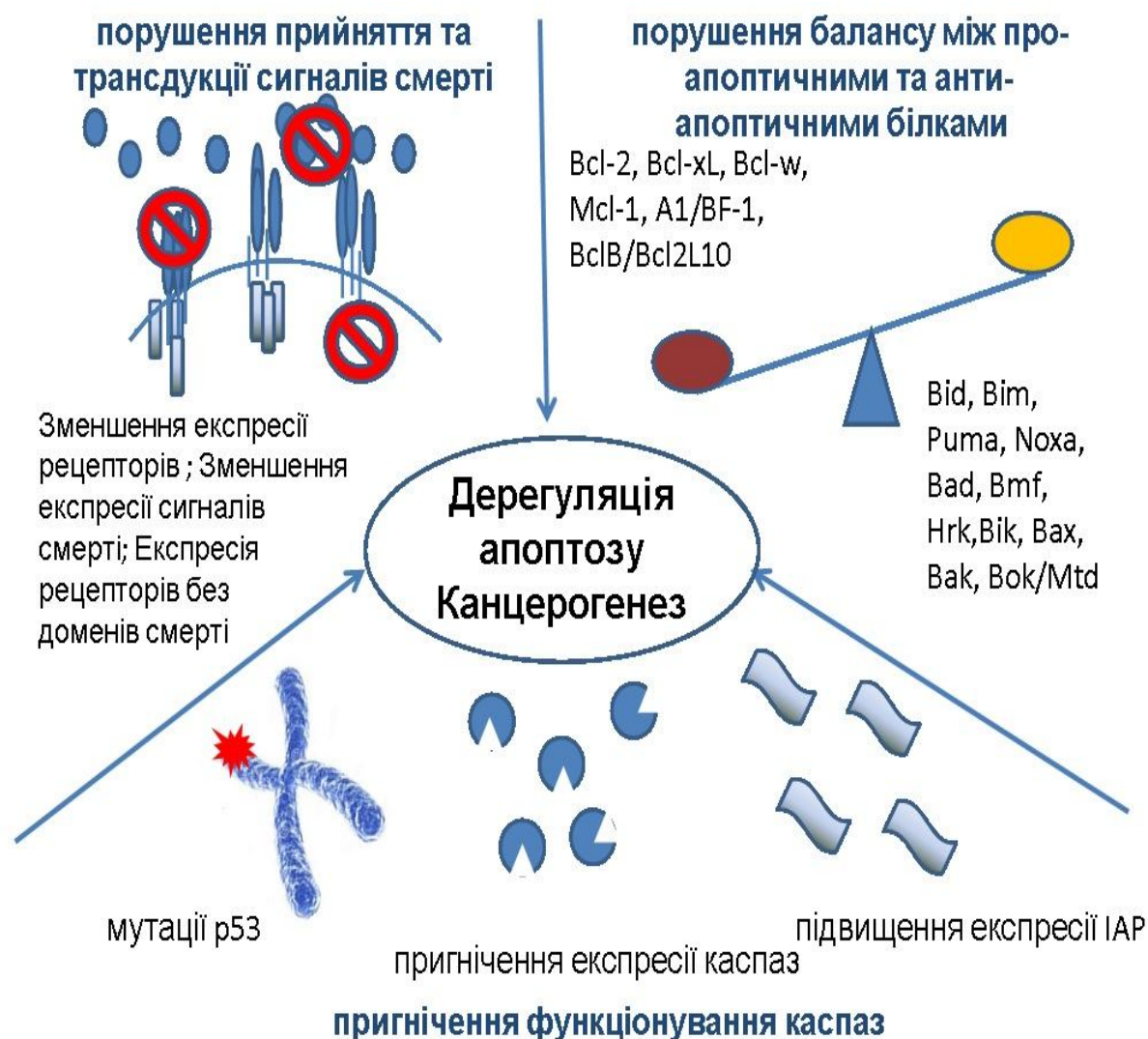


Рис.1. Можливі шляхи виникнення резистентності малігнізованих клітин до апоптозу: 1) порушення балансу між проапоптичними та антиапоптичними білками у клітині відбувається вразі пригнічення експресії антиапоптичних білків (Bcl-2, Bcl-xL, Bcl-w, Mcl-1, A1/BF-1, BclB/Bcl2L10) та підвищення рівня експресії проапоптичних білків (Bid, Bim, Puma, Noxa, Bad, Bmf, Hrk, Bik, Bax, Bak, Bok/Mtd); 2) пригнічення функціонування каспаз внаслідок генетичних мутацій; 3) порушення прийняття та трансдукції сигналів смерті виникає внаслідок зменшення рівня експресії рецепторів смерті, або зменшення рівня експресії сигналів смерті чи появи мутантних форм рецепторів без доменів смерті

Додаток В

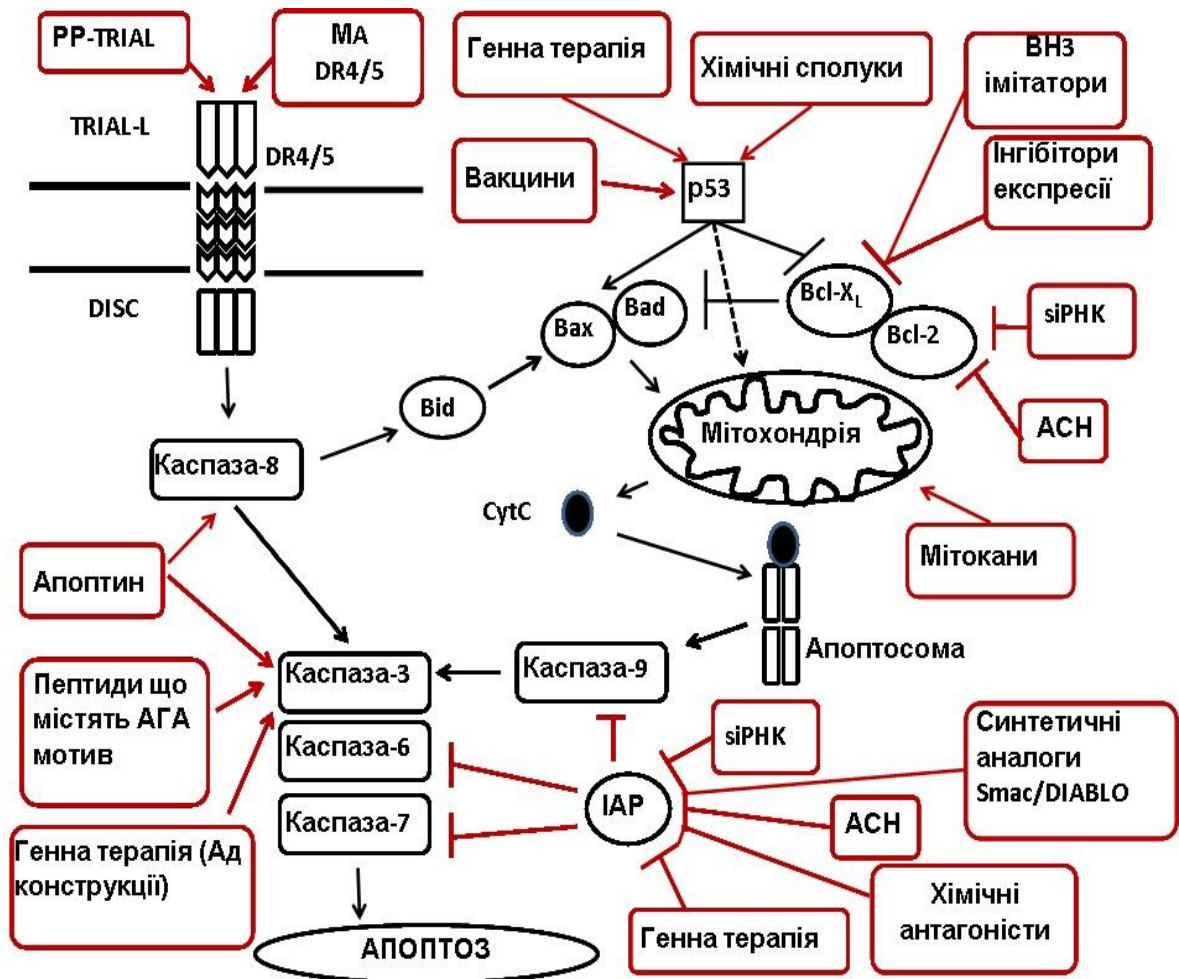


Рис.1 Рецептор-залежний та мітохондріальний сигнальні шляхи апоптозу. Мішені та стратегії протипухлинної терапії. TRIAL-L – апоптозоіндукуючий рецептор; TRIALR1/R2 - TRAIL TNF- подібний ліганд, що індукує апоптоз (tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand) receptors 1/2); DISC - death-inducing signaling complex сигнальний комплекс що включає загибель; Smac/DIABLO – другий активатор каспаз, що продукується мітохондріями, прямий білок-зв'язувач IAP; CytC – цитохрохром с; Ад - аденовірусні конструкції; пептиди що містять АГА (аргінін-гліцин-аспартат) мотив; MAR1/R2- Моноклональні антитіла R1/R2; PP-TRIAL – розчинний рекомбінантний TRIAL; IAP – інгібітори каспаз; ACH - антисенсові нуклеотиди

Вплив лектинів на виживаність клітин ссавців

№ п.п	Лектин	Вуглеводна специфічність	Лінії клітин ссавців	Характер впливу лектинів та описані механізми	Посилання
1.	Лектин фітопатогенного гриба (<i>Sclerotium rolfsii</i>)	GalNAc GlcNAc	Культура клітини раку молочної залози людини MCF-7 та ZR-75.	Апоптоз, пригнічення проліферації	[61, 62]
2.	Лектин купини запашної (<i>Polygonatum odoratum</i>)	N-ацетил нейрамінова кислота та сіалоглікопротеїни	A549, L929, MCF-7	Ініціація апоптозу, пригнічення проліферації, автофагія (активація Akt-mTOR та міохондріального шляху, Ras-Raf-MEK-ERK опосередкований сигнальний шлях, ініціація каспазозалежного механізму апоптозу),	[60, 64, 65]
3.	Лектин омели звичайної (<i>Viscum Album</i>).	β-галактоза	Лінії клітин гліобластоми миші LNT-229 та LN-308; клітини ліній MCF-7 MDA-MB231, NALM6, Клітини гепатокарциноми SKHep1 і Hep 3B	Цитотоксичність, апоптоз (активація p53- і p21-незалежних шляхів, активація каспази 3, активація Bax, Bik, і Puma, пригнічення Bcl-2)	[66, 67, 70, 71-73]
4.	Конканавалін А (<i>Canavalia ensiforme</i>)	маноза	A375, B16 3T3, культура клітин гліобластоми, HeLa	Апоптоз і автофагія (вихід цитохрому с, ініціація каспази-9 і -3)	[76, 77]
5.	Лектин сої культурної (<i>Glycine hispida</i>)	N-ацетил-D-галактозамін	HeLa, лінії клітин гепатоми людини, хоріокарциноми, меланоми миші, остеосаркоми щурів	Апоптоз, цитотоксичність, автофагія (пошкодження ДНК, підвищення генерації активних форм кисню)	[83 – 85]
6.	Лектин клематису (<i>Clematis montana</i>)	маноза	L929, HeLa, MCF7 і HepG2	Пригнічення проліферації, апоптоз	[86, 87]
7.	Еритроаглютинін (<i>Phaseolus vulgaris</i>)	Складні вуглеводи, що містять галактозу	Культура клітин раку легенів людини	Апоптоз (вивільнення цитохрому с, ініціація каспази 3)	[8]