

О.О. КОВАЛЕНКО, Л.Л. ЛУКАШ

Інститут молекулярної біології та генетики НАН України,
Київ-143, вул. Акад. Заболотного, 150
E-mail: xsana@mail.ru, lukash@imbg.org.ua

ІНДУКЦІЯ АПОПТОЗУ У ПОПУЛЯЦІЯХ КЛІТИН ССАВЦІВ *IN VITRO* ПІД ВПЛИВОМ ЛЕКТИНІВ



При дослідженні цитотоксичної дії лектинів, різних за походженням та вуглеводною специфічністю, у культурі клітин китайського хом'ячка показано, що при високій концентрації (20 мкг/мл) всі вони здатні індукувати підвищення рівню апоптозу через 2 доби після обробки з високим ступенем вірогідності, а у випадку лектину ікри окуня — як відразу після обробки, так і через 2 доби. Виявлено, що у культурі клітин людини лектин бузини чорної на відміну від лектину сочевиці та ікри окуня не впливає на частоту апоптичних клітин. Зазначено тенденцію стимуляції проліферації клітин людини під впливом лектину ікри окуня за малої концентрації (0,2 мкг/мл).

© О.О. КОВАЛЕНКО, Л.Л. ЛУКАШ, 2007

Вступ. Лектини належать до широко розповсюджених у природі вуглеводзв'язуючих білків неїмуноглобулінової природи. Біологічна функція цих білків різноманітна: це і адгезія, і міграція, і проліферація, і диференціація клітин. Лектини завдяки своїй здатності специфічно зв'язуватись з вуглеводами на поверхні клітини широко застосовуються у гістології, медицині, а вибіркова токсичність деяких з них значно розширює можливості їхнього застосування в біології та медицині [1, 2].

У попередніх дослідженнях була показана здатність лектинів тваринного та рослинного походження впливати на мутаційний процес та проліферацію клітин ссавців залежно від концентрації [3, 4]. Ми висловили припущення, що одним з механізмів впливу на генетичні процеси може бути індукція програмованої загибелі клітин, або апоптоз. Апоптоз є захисна реакція біосистеми на чисельні пошкодження окремо взятої клітини або популяції клітин заради збереження цілісності та життєздатності всього організму. Ми припустили, що лектини при високих концентраціях здатні спричинити такі пошкодження.

Метою даної роботи було дослідити індукцію апоптозу у культурі клітин ссавців під впливом різних за походженням та вуглеводною специфічністю лектинів, а також залежність їхньої цитотоксичної активності від концентрації, що в цілому розширить наші знання про взаємодію екзогенних лектинів та клітини-реципієнта, допоможе наблизитись до розуміння механізмів вуглевод-білкових взаємодій, які впливають на стабільність геному.

Матеріали та методи. При проведенні досліджень використовували лектини рослинного (кора бузини чорної *Sambucus nigra*, насіння сочевиці *Lens culinaris*) та тваринного (ікра окуня *Persa fluviatilis*) походження, одержані з НВК «Лектинотест» (Львів). Всі експерименти проводились в умовах *in vitro* з використанням культури клітин китайського хом'ячка лінії B1ld-ii-FAF28C1237 та культури клітин людини А-102. Клітини культивувались у стандартних умовах [5].

Як позитивний контроль використовували протипухлинний антибіотик мітоміцин С (Sigma), механізм дії якого — індукція зшивок білка та ДНК. Цей алкілюючий агент використовували у концентрації 1 та 10 мкг/мл залежно від типу клітин.

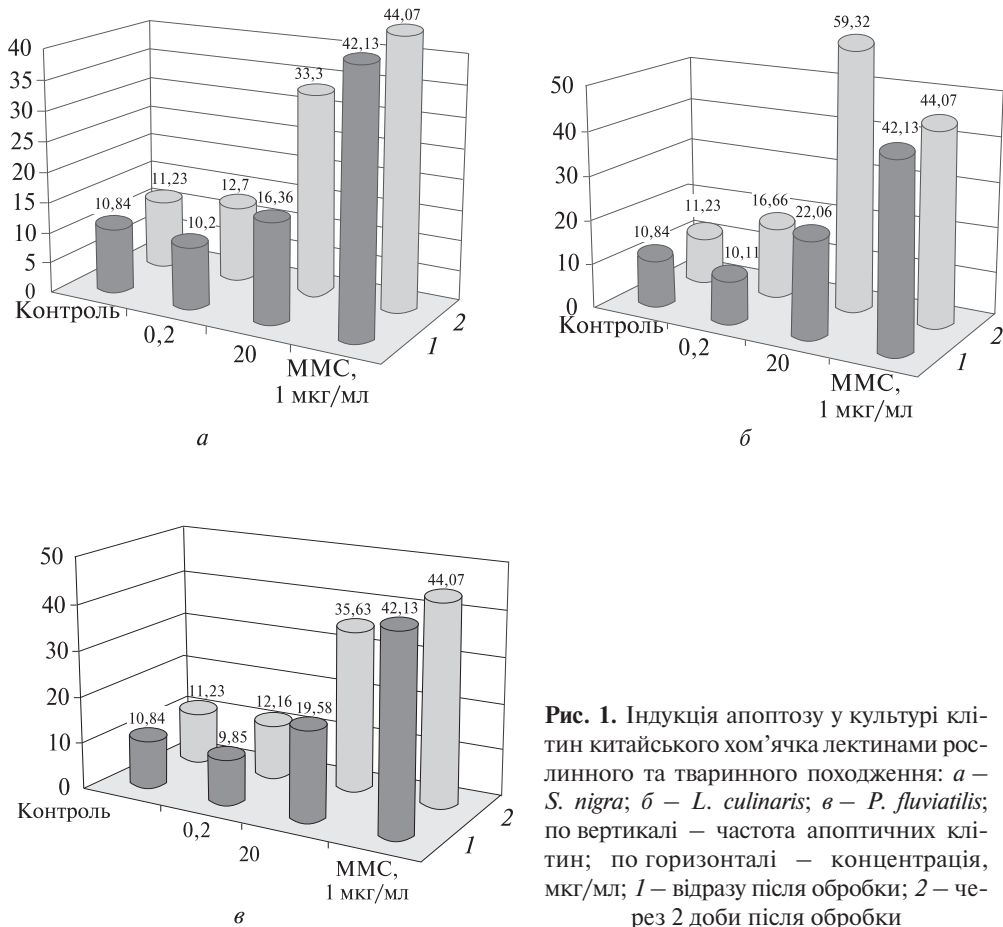


Рис. 1. Індукція апоптозу у культурі клітин китайського хом'ячка лектинами рослинного та тваринного походження: *а* – *S. nigra*; *б* – *L. culinaris*; *в* – *P. fluviatilis*; по вертикалі – частота апоптичних клітин; по горизонталі – концентрація, мкг/мл; *1* – відразу після обробки; *2* – через 2 доби після обробки

При вивченні впливу лектинів на рівень апоптозу у культурі клітин досліджували чинники використовувались у концентраціях 0,2 та 20 мкг/мл, обробка тривала 4 год у безсироватковому середовищі. Як контроль слугували клітини, що перебували у безсироватковому середовищі протягом 4 год. Аналіз клітинної популяції проводили відразу після обробки та через 2 доби після обробки клітин білками. Клітини відмивали розчином PBS двічі та фіксували 20 хв 75 %-ним спиртом. Фіксатор відмивали розчином PBS та інкубували з фарбником Benzimide B1155 у концентрації 0,1 мг/мл (Sigma) протягом 30 хв [9], після чого відмивали фарбник та готували препарат для проведення мікроскопічного аналізу.

Цитологічний аналіз проводили за допомогою люмінесцентного мікроскопу у поєднанні з фазово-контрастною мікроскопією. Аналізували морфологію клітинних ядер. Статистичну

обробку даних проводили за допомогою критерію χ^2 .

Результати досліджень та їх обговорення. При дослідженнях впливу лектинів на рівень апоптозу в різних концентраціях та у динаміці було показано, що усі досліджені нами лектини при високих концентраціях (20 мкг/мл) індукують підвищення рівню апоптозу у культурі клітин китайського хом'ячка (рис. 1). Аналіз розподілу частот апоптичних клітин у популяції за Пірсоном (χ^2) показав, що такий вплив був статистично вірогідним через 2 доби після обробки для усіх досліджуваних білків ($P < 0,001$ при $k = 1$ та 0,1 %-ному рівні значущості), і цей вплив можемо співставити з дією мітоміцину С. Підвищення частоти апоптичних клітин спостерігали і відразу після обробки лектинами, але лише у випадку ікри окуня цей вплив був статистично вірогідним ($P < 0,001$ при $k = 1$ та 0,1 %-ному рівні значущості).

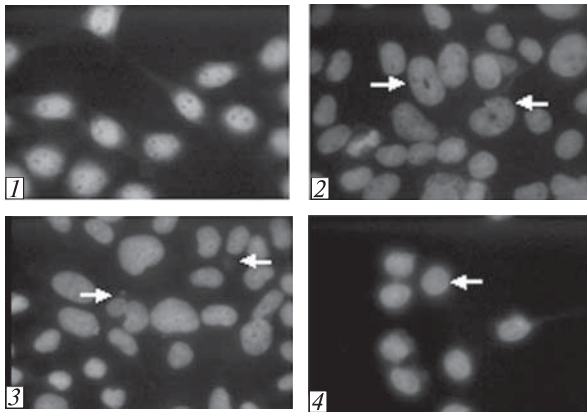


Рис. 2. Морфологічні зміни ядерного апарату культури клітин китайського хом'ячка через 2 доби після обробки лектинами: 1 – контроль; 2 – лектин ікри окуня; 3 – лектин кори бузини чорної; 4 – лектин насіння сочевиці. Концентрація лектинів 20 мкг/мл; $\times 630$

Усі лектини при концентрації 20 мкг/мл спричиняли декомпактизацію хроматину порівняно з контролем (рис. 2), також спостерігалось утворення розривів (рис. 2, 2) та хроматинових тілець (рис. 2, 3). Отримані дані узгоджуються з попередніми результатами, де при дослідженні впливу лектинів на проліферацію культур клітин та індукцію генних мутацій з використанням як моделі культури клітин китайського хом'ячка саме за високих концентрацій спостерігали чітко виражений мутагенний та цитотоксичний ефект лектинів [3, 4].

При концентрації лектинів 0,2 мкг/мл індукції апоптозу у культурі клітин китайського хом'ячка не спостерігали. Частота апоптичних клітин у цьому випадку істотно не відрізнялась від контролю як відразу, так і через 2 доби після обробки клітин лектинами (рис. 1).

З використанням як моделі культури клітин людини було показано, що лектин бузини чорної взагалі не впливав на рівень апоптозу як відразу, так і через 2 доби після обробки (рис. 3). На відміну від попередньої тест-системи частота апоптичних клітин у дослідних варіантах статистично вірогідно не відрізнялась від контрольних. В той же час лектини ікри окуня та насіння сочевиці у концентрації 20 мкг/мл статистично вірогідно підвищували частоту апоптичних клітин у культурі як відразу, так і через 2 доби після обробки ($P < 0,001$ при $k = 1$ та 0,1 %-ному рівні значущості) (рис. 4), при-

чому лектин сочевиці виявився більш активним у цьому відношенні: 30,2 % апоптичних клітин у популяції проти 23,94 % у випадку обробки лектином ікри окуня вже відразу після обробки. Для порівняння – частота апоптичних клітин після обробки мітоміцином С становила 38,51 %. При концентрації 0,2 мкг/мл, відразу після обробки, обидва лектини не впливали на частоту апоптичних клітин у популяції клітин А-102. Через 2 доби після обробки клітин лектином сочевиці кількість апоптичних клітин була на рівні контрольної. Дещо несподіваним виявився ефект лектину ікри окуня: у цьому дослідному варіанті ми спостерігали статистично вірогідне ($P < 0,001$ при $k = 1$ та 0,1 %-ному рівні значущості) зменшення частоти апоптичних клітин у дослідній культурі 8,8 % порівняно з 13,72 % у контролі.

Ці дані узгоджуються з результатами, які ми отримали раніше при дослідженні впливу лектинів на проліферацію культури клітин А-102, де лектин кори бузини у досліджуваних концентраціях не виявляв статистично вірогідного впливу на поділ клітин. Лектини бузини та ікри окуня при високих концентраціях інгібували поділ клітин на рівні з мітоміцином С, а при низькій концентрації лектину ікри окуня (0,2 мкг/мл) спостерігалось підвищення кількості клітин порівняно з контролем [3]. Можливо, такий ефект лектину ікри окуня ми спостерігали внаслідок прояву мітогенної активності білка у низькій концентрації відносно клітин людини. Це не суперечить даним про те, що деякі низькомолекулярні лектини тваринного походження містять у С-кінцевій ділянці домени типу епідермального фактора росту, що зумовлює їх здатність впливати на процеси поділу клітини [8].

Отже, можемо з певністю сказати, що досліджені нами лектини у високих концентраціях статистично вірогідно індукують програмовану загибель клітин ссавців внаслідок апоптозу. Це узгоджується з нашими даними щодо впливу лектинів на мутаційний процес та проліферацію у популяціях клітин ссавців *in vitro* [3, 4].

Отримані результати також свідчать на користь припущення щодо важливості саме структурно-функціональної організації лектинів RIP-класу та особливостей клітин-реципі-

Індукція апоптозу у популяціях клітин ссавців *in vitro* під впливом лектинів

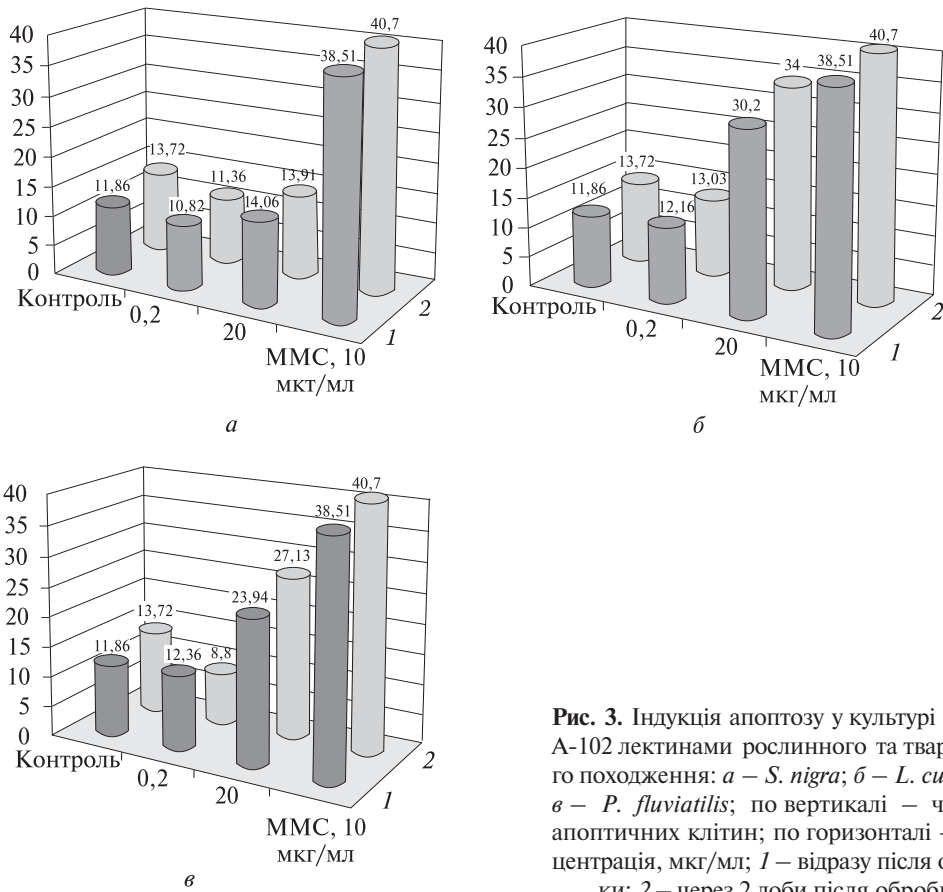


Рис. 3. Індукція апоптозу у культурі клітин А-102 лектинами рослинного та тваринного походження: *а* – *S. nigra*; *б* – *L. culinaris*; *в* – *P. fluvialis*; по вертикалі – частота апоптичних клітин; по горизонталі – концентрація, мкг/мл; 1 – відразу після обробки; 2 – через 2 доби після обробки

ентів для реалізації їхньої цитотоксичної дії. Так, одні й ті ж лектини з однаковими ензиматичними активностями по-різному поводити себе в різних модельних тест-системах: рослинні лектини (RIP-білки) по-різному впливали на проліферацію та рівень апоптозу клітин китайського хом'ячка та клітин людини.

Скоріш за все вплив лектинів на процеси поділу та програмованої загибелі клітини реалізуються не у прямий, а у опосередкований спосіб. На користь цього припущення свідчить і те, що для більш ефективної реалізації цитотоксичної дії так само, як і для прояву їхньої мутагенної дії [3], лектинам потрібен певний час. Оскільки для лектинів досі не була показана здатність проникати у ядро та, незважаючи на високу спорідненість до хромосомної ДНК [6], вони не могли взаємодіяти безпосередньо з нею, ми схильні вважати, що їхній вплив на проліферацію та індукцію апоп-

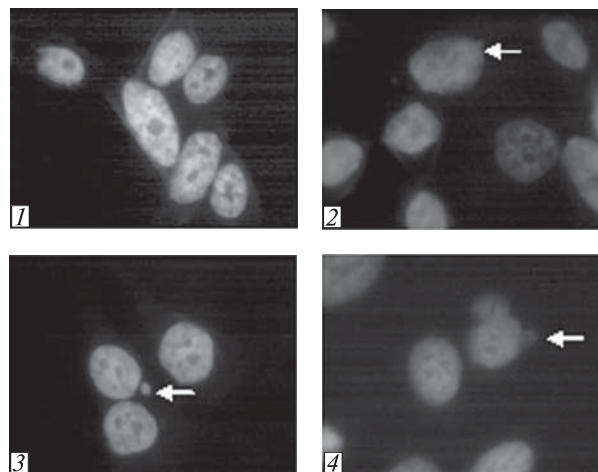


Рис. 4. Морфологічні зміни ядерного апарату культури клітин А-102 через 2 доби після обробки лектинами: 1 – контроль; 2 – мітоміцин С (10 мкг/мл); 3 – лектин ікри окуня; 4 – лектин насіння сочевиці. Концентрація лектинів 20 мкг/мл; $\times 630$

тозу у культурі клітин є наслідком втручання лектинів у процеси клітинного поділу та внутрішньоклітинного гомеостазу через їхні характерні ензимологічні активності. Так, досить добре відомо, що процес апоптозу залежить від співвідношення білків Bcl та Bax у мітохондріях. Домінування білків родини Bcl блокує запуск апоптозу, а інтенсивна експресія білків Bax стимулює реалізацію сигналу смерті. Можливо, лектини з глікозидазною активністю шляхом взаємодії з мРНК порушують у клітині баланс білків – регуляторів клітинного циклу. Не виключено також, що цей ефект є наслідком прояву мало досліджених ДНКазних активностей білків RIP, які скоріш за все діють на мітохондріальну ДНК, оскільки вона є більш доступним субстратом. Також можливо, що цей вплив реалізується за рахунок взаємодії з ендолектинами клітини-реципієнта, які, як відомо, відіграють важливу роль у регуляції клітинного циклу. Але це лише припущення, які потребують ґрунтовних досліджень.

Висновки. Таким чином, всі досліджувані лектини рослинного та тваринного походження виявили здатність до індукції апоптозу в популяціях клітин ссавців *in vitro*. Цитотоксичний ефект цих біологічних чинників, ймовірно, залежить від їхньої структурно-функціональної організації, типу клітин і особливостей взаємодії лектинів з клітинами-реципієнтами. В культурі клітин китайського хом'ячка виявлено пряму залежність частоти апоптичних клітин від концентрації досліджуваних лектинів; всі вони спричиняли статистично вірогідне підвищення рівня апоптозу при концентрації 20 мкг/мл. На відміну від цієї тест-системи в популяціях клітин людини лектин бузини чорної не проявляв цитотоксичної активності, але два інших лектини спричиняли значне підвищення частоти апоптичних клітин при концентрації 20 мкг/мл. Відносно лектину ікри окуня вперше детально досліджено його цитотоксичну дію в культурі клітин ссавців.

Одержані дані узгоджуються з результатами наших досліджень мутагенної активності лектинів. Так, нами показано раніше, що статистично вірогідний мутагенний ефект лектину бузини чорної в популяціях клітин китайського хом'ячка проявлявся при концентрації 20 мкг/мл. Для прояву як цитотоксичної, так і мутагенної

активностей лектину потрібний певний час – не менше ніж 2 доби після обробки. Ймовірно, лектини за умов прояву в тест-системі їхніх ензиматичних активностей спричиняють численні пошкодження ДНК, які з високою частотою призводять до запрограмованої загибелі клітин. Значно менша частка первинних генетичних ушкоджень реалізується в генні мутації, які можуть передаватись в поколіннях клітин, що культивуються *in vitro*.

SUMMARY. The cytotoxic action of lectins different in origin and carboxyl specificity has been studied. It has been shown that all types of lectins at high concentrations (20 mkg/ml) were able to induce apoptosis in the *in vitro* populations of Chinese hamster cells two days after the treatment. In the case of *Persa fluviatilis* lectin this effect was detected immediately after the treatment and two days later as well. It was shown that *Sambucus nigra* lectin did not influence the frequency of apoptosis in the culture of human cells in contrast to the *Lens culinaris* and *P. fluviatilis* lectins. The tendency of stimulation of human cell proliferation under exposure to *P. fluviatilis* lectin at low concentration (0,2 µg/ml) has been registered.

РЕЗЮМЕ. При исследовании цитотоксического действия лектинов, отличающихся по происхождению и углеводной специфичности, в культуре клеток китайского хомячка было показано, что при высокой концентрации (20 мкг/мл) все они способны индуцировать повышение уровня апоптоза через 2 дня после обработки с высокой степенью вероятности, в случае лектина икры окуня – как сразу, так и через 2 сут после обработки. Обнаружено, что в культуре клеток человека лектин бузины черной в отличие от лектинов чечевицы и икры окуня не влияет на частоту апоптозных клеток. Отмечена тенденция стимуляции пролиферации клеток человека под воздействием лектина икры окуня при низкой концентрации (0,2 мкг/мл).

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Loris R. Principles of structures of animal and plant lectins // *Biochim. et biophys. acta.* – 2002. – 1772. – P. 198–208.
2. Lis H., Sharon N. Lectins: carbohydrate specific proteins that mediate cellular recognition // *Chem. Rev.* – 1998. – 98. – P. 637–674.
3. Коваленко О.О., Костецька К.В., Лукаш Л.Л. Вплив лектинів різного походження на мутаційний процес у популяціях соматичних клітин ссавців // *Біополімери і клітина.* – 2006. – 22, № 1. – С. 33–38.
4. Лукаш Л.Л., Карпова И.С., Мирошниченко О.С., Тихонова Т.Н., Лыло В.В., Манько В.Г., Сухорада Е.М.,

- Голынская Е.Л. Влияние лектина соцветий *Sambucus nigra* на спонтанный и индуцированный алкилирующим агентом мутагенез в соматических клетках млекопитающих // Цитология и генетика. — 1997. — **31**, № 5. — С. 52—60.
5. Бужиевская Т.И., Лукаш Л.Л., Подольская С.В. Экспериментальные модели для изучения мутагенеза и трансформации, индуцированных вирусами и нуклеиновыми кислотами // Методы молекулярной биологии. — Киев : Наук. думка, 1986. — С. 147—158.
6. Barbieri L., Cidni M., Girbes T. et al. Enzymatic activity of toxic and non-toxic type 2 ribosome-inactivating proteins // FEBS Lett. — 2004. — **563**. — P. 219—222.
7. Peumans W.J., Hao Q., Van Damme E.J. Ribosome-inactivating proteins from plants: more than RNA N-glycosidases? // FASEB J. — 2001. — **15**. — P. 1493—1506.
8. Лахтин В.М. Молекулярная организация лектинов // Молекуляр. биология. — 1994. — **28**, вып. 2. — С. 245—273.
9. Фільченков О.О., Стойко Ф.С. Апоптоз і рак. Від теорії до практики. — Тернопіль : Укрмедичина, 2005. — 523 с.
10. Handzel M.J., Nishioka W.K., Raymons Y., Allis C.D., Basset-Jones D.P., Thrng P.H. Chromatin condensation not associated with apoptosis // J. Biol. Chem. — 1998. — **273**, № 38. — P. 24470—24478.
11. Maciorowski Z., Delic J., Padoy E., Klijanienko J., Dubray B., Cosset J.-M., Dumont J., Magdelenat H., Vielh Ph. Comparative analysis of apoptosis measured by hoechst and flow cytometry in non-hodgkins lymphomas // Cytometry. — 1998. — **32**, № 1. — P. 44—50.

Надійшла 10.06.06