

УДК575.113: 575.224

ІЗОФОРМИ ФІТОГЕМАГЛЮТИНІНУ ЯК ІНДУКТОРИ АПОПТОЗУ ПУХЛИННИХ КЛІТИН *IN VITRO*

Т. О. КОЧУБЕЙ, О. В. МАКСИМЧУК, Л. Л. МАЦЕВИЧ, О. О. ПІВЕНЬ, Л. Л. ЛУКАШ

Інститут молекулярної біології та генетики НАН України
Україна, 03143, Київ, вул. Заболотного, 150
e-mail: kochubei2009@ukr.net

Мета. Вивчити вплив фітогемаглютиніну (ФГА) та його окремих ізоформ на частоту апоптозу в культурі клітин раку гортані (Нер-2), а також дослідити можливі шляхи індукції апоптозу досліджуваними лектинами. **Методи.** Оцінку частоти апоптозних клітин проводили за допомогою методу забарвлення специфічними флюоресцентними барвниками. Рівень експресії медіаторів апоптозу (каспаза-3 і каспаза-8) та проапоптозного білка Вах вивчали із застосуванням Вестерн-блот-аналізу. **Результати.** Показано, що сумарний препарат ФГА та його ізоформи здатні індукувати апоптоз у культурі клітин раку гортані за умов експерименту. З'ясовано, що як сумарний препарат ФГА, так і його окремі ізоформи спричинюють апоптоз пухлинних клітин людини, індукуючи каспази-3 та -8, а також проапоптозний білок Вах. Виявлено, що ефективнішим індуктором як каспази 3, так і морфологічних змін ядра, типових для апоптозу, є глікопротеїнспецифічна еритроцитарна ізоформа (ФГА-Е). **Висновки.** Сумарний препарат ФГА та його окремі ізоформи спричинюють підвищення частоти апоптозу в культурі клітин раку гортані людини опосередковано за участі каспазозалежного і мітохондріального механізмів.

Ключові слова: фітогемаглютинін, ізоформи фітогемаглютиніну, апоптоз, каспаза-3, каспаза-8, білок Вах.

Вступ. Відомо, що вуглевод-білкові взаємодії лежать в основі багатьох біологічних процесів, і саме тому лектини широко використовують для розробки нових підходів діагностування та ідентифікації злоякісних клітин [1], вивчення процесу клітинного поділу та проведення цитологічних досліджень [2,3]. Активне вивчення лектинів та застосування на практиці [1–3] стимулює і розвиток фундаментальних досліджень у цій галузі. Актуальними стають роботи із вивчення неканонічних властивостей цієї групи білків, а саме: вплив на такі процеси як проліферацію та апоптоз [4–7].

Мітогенну активність ФГА відкрито на початку 60-х років ХХ сторіччя [8,9]. Сумарний препарат фітогемаглютиніну (ФГА-Р) має вуглеводну специфічність до олігосахаридів, тоді як його лейкоцитарна ізоформа (ФГА-Л) має спорідненість до вуглеводів, що містять манозу, а еритроцитарна (ФГА-Е), – до глікопротеїнів [9,10]. Також показано, що ФГА-Л, на відміну від ФГА-Е, здатна 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 [10]. Описана різниця вуглеводної специфічності зазначених лектинів пояснює і відмінності їхнього специфічного зв'язування з поверхневими клітинними рецепторами відповідно до відмінності в механізмах реалізації біологічної активності ізо-

© Т. О. КОЧУБЕЙ, О. В. МАКСИМЧУК, Л. Л. МАЦЕВИЧ, О. О. ПІВЕНЬ, Л. Л. ЛУКАШ, 2013

форм фітогемаглютиніну. Варто також зауважити, що окрім мітогенної дії ФГА має й інші біологічні ефекти, які в свою чергу недостатньо вивчені, хоча для деяких лектинів-мітогенів описані і зворотні властивості, а саме індукція апоптозу [4]. За останніми літературними даними показано, що ФГА здатен індукувати харчові алергії [5]. Нещодавно показано здатність еритроцитарної ізоформи ФГА індукувати апоптоз у культурі клітин раку легень людини [7]. Проте не відомо, чи лише еритроцитарна ізоформа ФГА здатна індукувати апоптоз і які ще, окрім мітохондріального шляху, сигнальні системи клітини залучені до реалізації проапоптозної дії лектинів ФГА.

Раніше нами та іншими авторами показано здатність деяких лектинів рослинного та тваринного походження дозозалежно впливати на проліферацію клітин ссавців та індукувати апоптозні зміни, як описано в огляді літератури та експериментальних дослідженнях [11,12]. І хоча для окремих лектинів показана лектино-асоційована ензиматична активність [13], завдяки якій вони здатні безпосередньо взаємодіяти з макромолекулами у клітині, більшість із них реалізує свою активність опосередковано, через взаємодію з вуглеводними детермінантами на поверхні клітинної мембрани. Однак ми висунули припущення, що важливе значення при реалізації впливу лектинів на сигнально-регуляторні системи мають не лише вуглевод-білкові взаємодії, а й білок-білкові взаємодії, які можуть бути реалізовані за певних умов, і таким чином лектини здатні взаємодіяти з білками на поверхні клітинної мембрани.

Метою даної роботи було вивчити вплив сумарного препарату та ізоформ фітогемаглютиніну на частоту апоптозу в культурі клітин раку гортані та дослідити можливі шляхи індукції апоптозу цими білками.

Матеріали і методи

Досліджували вплив комерційних препаратів лектинів квасолі звичайної *Phaseolus vulgaris* – фітогемаглютинін ФГА («ЛЕКТИНОТЕСТ», Львів) на апоптозні процеси. Як модельну тест-систему використовували лінію клітин раку гортані людини Нер-2. Клітини культивували у стандартному ростовому середовищі «Ігла» (MEM, Sigma, USA), що містило 5 % ембріональної сироватки великої рогатої худоби (Sigma, USA) та антибіотики пеніцилін та стрептоміцин (Sigma, USA) по 100 Од./мл [14].

Визначення апоптозного індексу проводили методом забарвлення специфічними барвниками етидіум бромідом та акридиновим оранжевим за методикою, що описана раніше [15]. Клітини обробляли ФГА-Р, ФГА-Е та ФГА-Л у концентрації 1мкг/мл протягом 4 годин з подальшим аналізом відразу після завершення обробки та через 12 год культивування. Як контроль досліду використовували клітини модельної лінії, які культивували за тих же умов, але не обробляли досліджуваними лектинами. При дослідженні апоптозу як додатковий позитивний контроль використовували культуру клітин, що були оброблені N-метил-N'-нітро-N-нітрозогуанідином (МННГ) у концентрації 5 мкг/мл впродовж 1 год. Препарати аналізували за допомогою люмінесцентної мікроскопії (збільшення 90x), ЛОМО, Росія.

Дослідження змін рівня експресії білків-медіаторів апоптозу (каспази -3 та -8), а також проапоптозного білка Вах під дією зазначених лектинів проводили із застосуванням Вестерн-блот-аналізу [16]. Для виділення загального білка клітини культивували в стандартних умовах, обробляли досліджуваними лектинами у концентрації 1 мкг/мл протягом 4 годин. Сумарний білок виділяли за методом [17] та розділяли за допомогою електрофорезу в 15 %-му поліакриламідному гелі у присутності 0,1 %-го

додецилсульфату натрію за методом Лемлі [18]. Для оцінки рівня експресії білків використовували комерційні специфічні поліклональні антитіла Santa Cruz Biotechnology, inc Cleaved caspase-3 p11 (h 176)-R: sc-22171; Cleaved caspase-8 p18 (H134): Sc-7890, Sigma Anti-BAX HPA027878, а як контроль рівномірності навантаження доріжок білком – антитіла до гліцеральдегід-фосфат-дегідрогенази (GAPD)[19]. Проведено три повтори кожного експерименту. Кількість досліджуваних білків представлено у відносних одиницях, які вираховували як відношення вмісту досліджуваного білка до вмісту контрольного білка GAPD на тій самій доріжці гелю. Для статистичної обробки результатів дослідження використовували пакет статистичних програм STATISTICA 7.0 (StatSoft, Inc. 2004, США), а для оцінки різниці показників – *t*-критерій Стьюдента.

Результати та обговорення

У попередній роботі нами показано, що ізоформи ФГА-Л та ФГА-Е, а також ФГА-Р у концентраціях від 1 до 1000 мкг/мл інгібують ріст культури ракових клітин в умовах *in vitro* [20]. Можливим шляхом впливу на ріст клітин у культурі є цитотоксична активність досліджуваних білків, одним із проявів якої, в свою чергу, може бути індукція апоптозу. Тому в даній роботі вивчали здатності досліджуваних лектинів індукувати апоптозні процеси в культурі клітин *in vitro*.

При дослідженні впливу препарату ФГА-Р та його ізоформ ФГА-Е і ФГА-Л на частоту апоптозних клітин показано, що обробка лектинами у концентрації 1 мкг/мл призводила до зменшення кількості живих клітин у культурі порівняно з контролем (рис. 1). Розподіл частот живих та апоптозних клітин для усіх дослідних варіантів (крім ФГА-Е через 12 годин після обробки) ста-

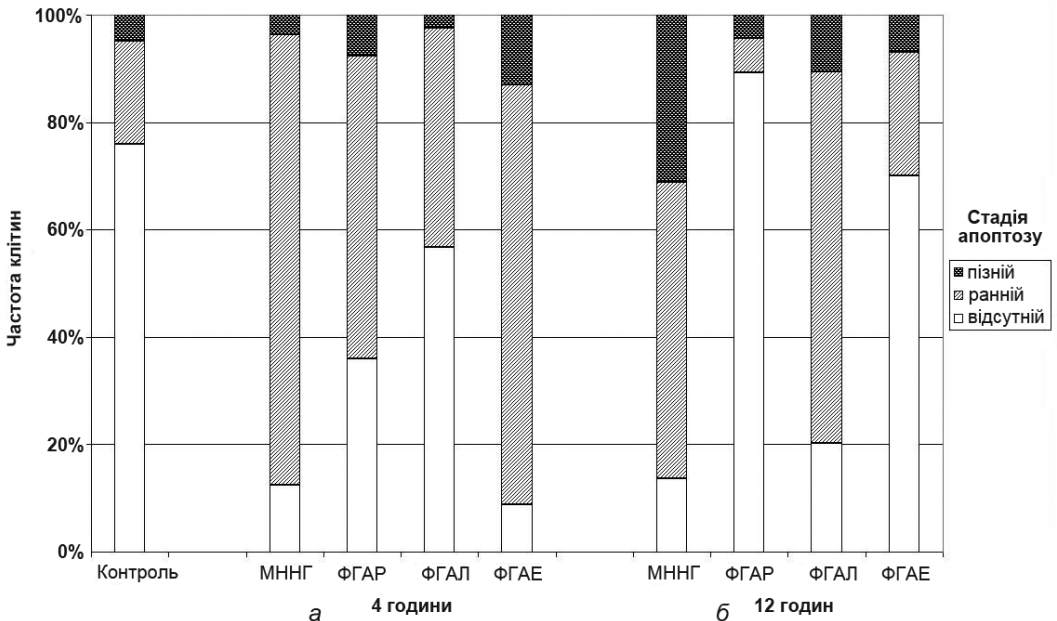


Рис. 1. Індукція апоптозних клітин сумарним препаратом ФГА та його ізоформами за умов різних варіантів обробки у культурі клітин Нер-2. Концентрація досліджуваних білків становила 1 мкг/мл, врахування частоти апоптозних клітин проводили відразу після обробки (а) та через 12 годин після обробки (б): МННГ-*N*-метил-*N'*-нітро-*N*-нітрозогуанідин; ФГА-Р-сумарний препарат фітогемаглютиніну; ФГА-Л – лейкоцитарна ізоформа фітогемаглютиніну; ФГА-Е-еритроцитарна ізоформа фітогемаглютиніну

тистично відрізнявся від контролю ($p < 0,05$).

Одразу після обробки найвищу частоту апоптозних клітин спостерігали в культурах, оброблених ФГА-Е – 92,13 %. Цей показник можна зіставити з дією МННГ, що спричиняв індукцію апоптозу в 92,57 % клітин. Лейкоцитарна ізоформа виявилася менш ефективним індуктором підвищення частоти апоптозних клітин – 43,24 %. За своєю апоптозною дією препарат ФГА-Р займав проміжне місце порівняно з дією його ізоформ.

Аналізуючи частоту живих та апоптозних клітин після 12-годинної постінкубації досліджуваними лектинами у концентрації 1 мкг/мл, з'ясували, що біологічна активність ізоформ мала дещо інший характер, порівняно із попереднім варіантом, де враховували число апоптозних клітин відразу після обробки (рис. 1а).

Так, не виявлено статистично достовірних відмінностей між частотами апоптозних клітин у контролі та в клітинах, що були оброблені еритроцитарною ізоформою. В той же час лейкоцитарна ізоформа індуквала апоптоз в клітинах на рівні 79,71 %, що наближається до ефекту, спричиненого МННГ – на відміну від культур, оброблених лектинами протягом 4 годин. Достовірно ($p < 0,001$) відрізнявся від контролю також і розподіл частот живих та апоптозних клітин після обробки ФГА-Р: кількість живих клітин була навіть вищою, ніж у контролі, і становила 89,29 %.

Цей феномен можна пояснити загибеллю та повною деструкцією частини клітин із подальшим розмноженням клітин, стійких до дії цих чинників, у яких під впливом еритроцитарної ізоформи та сумарного препарату ФГА відбулася індукція апоптозу. Проте у випадку ФГА-Л зниження частоти апоптозних клітин після 12-годинної постінкубації не спостерігали. Ця відмінність може мати ряд пояснень, серед яких – можливість присутності в клітинній культу-

рі субпопуляції клітин, стійких до проапоптозної дії ФГА-Е (але не ФГА-Л); або ж ймовірна здатність досліджуваних клітин адаптуватися до пошкоджуючої дії еритроцитарної ізоформи лектину шляхом індукції тих чи інших захисних механізмів клітини.

Це припущення підтверджується нашими попередньо отриманими даними щодо вираженої цитотоксичності ФГА-Р та його ізоформ, показаної на культурі клітин Нер-2 [20].

Наступним етапом нашої роботи було з'ясувати, які саме молекулярні механізми залучені до реалізації апоптозної дії досліджуваних білків. Із використанням Вестерн-блот-аналізу ми дослідили зміни експресії ініціаторної каспази-8 та ефекторної каспази-3, а також проапоптозного білка Вах.

Як позитивний контроль використовували МННГ, що є активним індуктором апоптозу, проте його дія опосередкована не через каспазний каскад, а через каспазонезалежний механізм із залученням АІФ-білка [21].

У результаті проведеної роботи виявлено, що обробка культури клітин Нер-2 досліджуваними білками протягом 4 год статистично достовірно індукуює підвищення рівня експресії каспази-3 порівняно із контролем (рис 2, а).

Зростання рівня експресії останньої було майже вдвічі вищим після обробки клітин ФГА-Е порівняно із дією ФГА-Л та ФГА-Р.

Рівень експресії каспази-8 також був статистично достовірно вищим після обробки лектинами порівняно із контролем (рис. 2, б). При цьому максимальне підвищення рівня експресії каспази-8 спостерігали після обробки клітин сумарним препаратом ФГА.

Виявили статистично достовірне підвищення рівня експресії Вах у культурі клітин, обробленої різними ізоформами лектину.

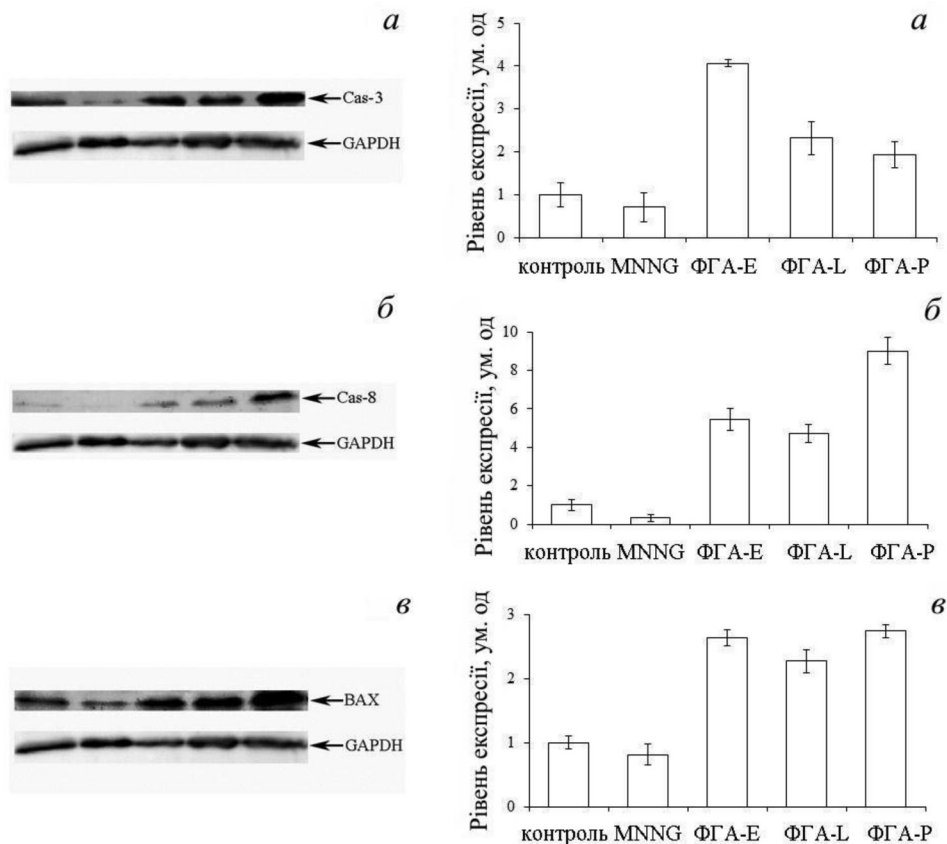


Рис. 2. Активация медиаторов апоптозу на рівні білка сумарним препаратом ФГА та його окремими ізоформами (1 мкг/мл) у культурі клітин Нер-2. Тривалість обробки становила 4 год. Кількісні зміни рівня експресії білка об'єкту вивчення відносно GAPDH: а – каспаза-3; б – каспаза-8; в – Вах; MNNG-N-метил-N'-нітро-N-нітрозогуанідин; ФГА-Е– еритроцитарна ізоформа фітогемаглютиніну; ФГА-Л – лейкоцитарна ізоформа фітогемаглютиніну; ФГА-Р– сумарний препарат фітогемаглютиніну, GAPDH– гліцеральдегід-фосфат-дегідрогеназа

Таким чином, виявлено відмінності між експресією каспаз та Вах білка в культурах клітин, оброблених різними препаратами ФГА. Ізоформа ФГА-Е індукувала значне зростання експресії каспази-3, що незворотно призводить до апоптозу, та дещо більше підвищувала експресію Вах, тоді як сумарний препарат цього лектину найактивніше індукував підвищення експресії ініціаторної каспази-8.

Дані про максимальну індукцію каспази-3 ФГА-Е добре узгоджуються із результатами кількісного аналізу апоптозних клі-

тин одразу після обробки лектином (рис. 1а). Саме у цьому варіанті дослідження спостерігали найвищий відсоток клітин у ранній та пізній стадії апоптозу одразу після обробки ФГА-Е у концентрації 1 мкг/мл.

Отримані нами дані також свідчать про те, що як ФГА-Р, так і його окремі ізоформи ефективно індукують активацію ініціаторної каспази-8, яка, у свою чергу, бере участь у активації цілого каскаду каспаз, у тому числі і ефекторної каспази-3. Окрім того, активація каспази-8 призводить і до активації білка Вах, який, за літературними

даними [22], у комплексі із порином призводить до утворення каналу у зовнішній мембрані мітохондрій та спричиняє вивільнення цитохрому С та AIF із мітохондрій.

Спостерігали підвищення рівня експресії білка Вах після обробки досліджуваними агентами, причому як при дії ФГА-Р, так і його окремих ізоформ рівень підвищення білка був вірогідно вищим порівняно із контролем (рис 2, в). Ці дані можуть свідчити про можливість активації досліджуваними лектинами апоптозу за участі каспазозалежного і мітохондріального механізмів. Більш високий ефект ФГА-Е на індукцію каспази-3 порівняно із іншими досліджуваними лектинами, можливо, пояснюється тим, що цей білок на відміну від лейкоцитарної ізоформи має вуглеводну специфічність до глікопротеїнів [10], які, як відомо, є структурними компонентами багатьох рецепторів на поверхні клітини. Можливо, завдяки своїй вуглеводній специфічності ізоформа ФГА-Е здатна зв'язуватися та активувати більшу кількість рецепторів смерті, таких як TNF та FAS, але такі припущення потребують подальшої перевірки.

Наразі варто зазначити, що сам факт індукції лектинами апоптозу за участі каспазозалежного та мітохондріального механізмів у культурі клітин раку гортані є важливим і з точки зору розробки нових підходів до терапії онкологічних захворювань. Відомо, що ідея впливу на специфічні рецептори смерті пухлинних клітин активно розвивається останнім часом, оскільки ці рецептори безпосередньо пов'язані із дією каспаз. Більше того, на противагу багатьом хіміотерапевтичним засобам та радіотерапії, рецептори смерті ініціюють апоптоз незалежно від p53, який внаслідок мутацій дезактивується у переважній більшості пухлин людини. Та, незважаючи на такі переваги, клінічне використання як TNF, так і CD95L досить ускладнене через їхню цитотоксичність [23]. Тож, на нашу думку, можливість використання лектинів

для специфічної активації рецепторів смерті та апоптозу ракових клітин може бути досить цікавою альтернативою використання специфічних антитіл.

Висновки

Показано, що сумарний препарат фітогемаглютиніну та його окремі ізоформи індують підвищення частоти апоптозу в культурі клітин раку гортані людини за участі каспазозалежного і мітохондріального механізмів. За короткотривалого дослідження найефективнішим індуктором як каспази-3, так і морфологічних змін ядра, типових для апоптозу, виявилася глікопротеїнспецифічна ізоформа ФГА-Е – проте при тривалішій експозиції у експерименті ставав більш вираженим проапоптичний вплив ФГА-L на стан клітинного ядра.

Перелік літератури

1. Lima L.R., Bezerra M.F., Almeida S.M., Silva L.P., Beltrao E.I., Carvalho Junior L.B. Glycophenotype evaluation in cutaneous tumors using lectins labeled with acridinium ester // Dis. Markers. – 2013. – Vol. 35, № 3. – P. 149–154.
2. Rkgo M., Silva L., Medeiros J., Figueiredo R., Alves-Junior S., Beltrao E. Con A conjugated to Europium(III) cryptate as a new histological tool for prostate cancer investigation using confocal microscopy // Biotech. Histochem. 2013 Oct 28. [Epub ahead of print].
3. Chunhua R., Zhao R.C. Essentials of Mesenchymal Stem Cell Biology and Its Clinical Translation Springer. – Dordrecht: Science & Business, 2013. – P. 321.
4. Guo W., Liu W., Hong S., Liu H., Qian C., Shen Y., Wu X., Sun Y., Xu Q. Mitochondria-dependent apoptosis of con A-activated T lymphocytes induced by asiatic acid for preventing murine fulminant hepatitis // PLoS One. – 2012. – Vol. 7, № 9. – P. 46018.
5. Kumar S., Verma A.K., Sharma A., Kumar D., Tripathi A., Chaudhari B.P., Das M., Jain S.K., Dwivedi P.D. Phytohemagglutinins augment red kidney bean (*Phaseolus vulgaris* L.) induced allergic manifestations // J. Proteomics. – 2013. – Vol. 93. – P. 50–64.
6. Lichtenstein R.G., Rabinovich G.A. Glycobiology of cell death: when glycans and lectins govern cell

- fate // Cell Death Differ. – 2013. – Vol. 20, № 8. – P. 976–86.
7. Kuo W.T., Ho Y.J., Kuo S.M., Lin F.H., Tsai F.J., Chen Y.S., Dong G.C., Yao C.H. Induction of the mitochondria apoptosis pathway by phytohemagglutinin erythroagglutinin in human lung cancer cells // Ann. Surg. Oncol. – 2011. – Vol. 18, № 3. – P. 848–856.
 8. Miller I.B., Hsu R., Heinrikson R., Yachnin S. Extensive homology between the subunits of the phytohemagglutinin mitogenic protein derived from *Phaseolus vulgaris* // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. – 1975. – Vol. 72, № 4. – P. 1388–1391.
 9. Antonyuk V.O. The lectins and their resources. – Lviv: Kvant, 2005. – 554 p.
 10. Yamamoto H., Swoger J., Greene S., Saito T., Hurh J., Sweeley C., Leestma J., Mkrdichian E., Cerullo L., Nishikawa A., Ihara Y., Taniguchi N., Moskal J.R. Beta1,6-N-acetylglucosamine-bearing N-glycans in human gliomas: implications for a role in regulating invasivity // Cancer Res. – 2000. – Vol. 60, № 1. – P. 134–142.
 11. Piven O.O., Lukash L.L. Influence of exogenous proteins on mutagenic process // Tsitologija i genetika. – 2011. – Vol. 45, № 1. – P. 68–93.
 12. Kovalenko O.O., Lukash L.L. Induction of apoptosis in the populations of mammalian cells *in vitro* under the influence of lectins // Tsitologija i genetika. – 2007. – Vol. 41, № 5. – P. 48–53.
 13. Peumans W., Hao Q., Van Damm E. Ribosome-inactivating proteins from plants: more than RNA N-glycosidases? // The FASEB Journal. – 2001. – Vol. 15, № 9. – P. 1493–1506.
 14. Lukash L.L., Paton E.B., Sukhorada E.M., Ruban T.A., Krupskaja I.S., Kostetskaia E.V., Bratsiuk S.I. The evaluation of the cytotoxicity of preparations with anticarcinogenic action in human cell cultures. // Tsitologija i genetika. – 1997. – Vol. 31, № 6. – P. 26–34.
 15. McGanon A.J., Martin S.J., Bissonnette R.P. The end of the (cell) line: methods for the study of apoptosis *in vitro* // Methods in cell biology / Ed. Schwartz L.M., Osborne B.A. – Acad. Press Inc. "Cell Death". – 1995. – Vol. 46. – P. 172–173.
 16. Maniatis T., Fritsch E. F., Sambrook J. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. – M.: Mir, 1984. – 425 p.
 17. Morton E. N., Margison G. P. Increased O⁶-alkylguanine-DNA alkyltransferase activity in Chinese hamster V-79 cells following selection with chloroethylating agents // Carcinogenesis. – 1988. – Vol. 9. – P. 45–49.
 18. Laemmli U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4 // Nature. – 1970. – Vol. 227. – P. 680–685.
 19. Sidorik L., Kyamova R., Bobyk V., Kapustian L., Rozhko O., Vigontina O., Ryabenko D., Danko I., Maksymchuk O., Kovalenko V., Filonenko V., Chaschin N. Molecular chaperone, HSP60, and cytochrome P450 2E1 co-expression in dilated cardiomyopathy // Cell Biol. Int. – 2005. – Vol. 29, № 1. – P. 51–55.
 20. Kochubei T.O., Piven O.O., Karpova I.S., Lukash L.L. Influence of total PHA and its isoforms on cell proliferation, survival and apoptosis of cells different origin *in vitro* // Actual problems of obstetrics, gynecology, clinical immunology and medical genetics. – Kyiv-Lugansk, 2010. – Vol. 19. – P. 250–257.
 21. Wang D., Liang J., Zhang Y., Gui B., Wang F., Yi X., Sun L., Yao Z., Shang Y. Steroid receptor coactivator-interacting protein (SIP) inhibits caspase-independent apoptosis by preventing apoptosis-inducing factor (AIF) from being released from mitochondria. // J. Biol. Chem. – 2012. – Vol. 287, № 16. – P. 12612–12621.
 22. Marzo I., Brenner C., Zamzami N., Jürgensmeier J.M., Susin S.A., Vieira H.L., Prévost M.C., Xie Z., Matsuyama S., Reed J.C., Kroemer G. Bax and adenine nucleotide translocator cooperate in the mitochondrial control of apoptosis. // Science. – 1998. – Vol. 281, № 5385. – P. 2027–2031.
 23. Sheridan J.P., Marsters S.A., Pitti R.M., Gurney A., Skubatch M., Baldwin D., Ramakrishnan L., Gray C.L., Baker K., Wood W.I., Goddard A.D., Godowski P., Ashkenazi A. Control of TRAIL-induced apoptosis by a family of signaling and decoy receptors. // Science. – 1997. – Vol. 277, № 5327. – P. 818–21.

Представлено В.А. Кунахом
Надійшла 21. 11.2013

**ИЗОФОРМЫ ФИТОГЕМАГЛЮТИНИНА
КАК ИНДУКТОРЫ АПОПТОЗА
ОПУХОЛЕВЫХ КЛЕТОК *IN VITRO***

*Т.А. Кочубей, О.В. Максимчук, Л.Л. Мацевич,
О.О. Пивень, Л.Л. Лукаш*

Институт молекулярной биологии и генетики НАН
Украины
Украина, 03143, Киев, ул. Заболотного, 150
e-mail: kochubei2009@ukr.net

Цель. Исследовать влияние лектинов на частоту апоптоза в культуре клеток рака гортани, а также выяснить возможные молекулярные механизмы индукции апоптоза суммарным препаратом ФГА и его отдельными изоформами.
Методы. Применены методы оценки апоптоза

путем окраски флюоресцентными красителями и Вестерн-блот-анализ. **Результаты.** Показано, что лектины способны индуцировать апоптоз в культуре клеток рака гортани в условиях эксперимента. Выяснено, что как суммарный препарат, так и отдельные изоформы ФГА вызывают апоптоз злокачественных клеток, активируя каспазы-3 и -8, а также проапоптотический белок Bax. Выявлено, что более эффективным индуктором как каспазы-3, так и морфологических изменений ядра, типичных для апоптоза, оказалась гликопротеинспецифичная изоформа ФГА-Е. **Выводы.** Суммарный препарат ФГА и его отдельные изоформы вызывают повышение частоты апоптоза в культуре клеток рака гортани человека опосредованно через активацию каспаз и, вероятно, при участии каспазозависимого и митохондриального механизмов.

Ключевые слова: фитогемаглютинин, изолектины, апоптоз, каспаза-3, каспаза-8, белок Bax.

PHYTOHEMAGGLUTININ ISOFORMS AS INDUCERS OF APOPTOSIS IN TUMOR CELLS *IN VITRO*

*T.O. Kochubei, O.V. Maksymchuk,
L.L. Macewicz, O.O. Piven, L.L. Lukash*

Institute of Molecular Biology and Genetics NAS
Ukraine
Ukraine, 03143, Kyiv, Zabolotnoho Str., 150
e-mail: kochubei2009@ukr.net

Aim. To study the effect of phytohemagglutinin (PHA) and its specific isoforms on the frequency of apoptosis in cell culture of larynx cancer (Hep-2), and explore possible ways for apoptosis inducing by lectins studied. **Methods.** Evaluation of the apoptotic cells frequency was performed using specific fluorescent staining dyes. The level of expression for mediators of apoptosis (caspase-3 and caspase-8) and Bax proapoptotic protein was studied using Western blot analysis. **Results.** The total PHA drug and its isoforms were shown to be able to induce apoptosis in larynx cancer cell culture under experimental conditions. Both the total PHA drug and its individual isoforms were found to cause apoptosis in human tumor cells, inducing caspase-3 and - 8 as well as proapoptotic Bax protein. Most effective inducer of both caspase 3 and morphological changes of the nucleus, typical for apoptosis proved to be the glycoprotein-specific erythrocytic isoform (PHA-E). **Conclusions.** Total PHA drug and its individual isoforms may cause increased frequency of apoptosis in human larynx cancer cell culture indirectly involving caspase-dependent and mitochondrial mechanisms.

Key words: phytohemagglutinin, isolectins, apoptosis, caspase-3, caspase-8, Bax protein.