

УДК575.113: 575.224

ВПЛИВ ФІТОГЕМАГЛЮТИНІНУ *PHASEOLUS VULGARIS* ТА ЙОГО ІЗОФОРМ НА ПРОЛІФЕРАЦІЮ ТА ВИЖИВАННЯ КЛІТИН ССАВЦІВ *IN VITRO*

Т.О. КОЧУБЕЙ, О.О. ПІВЕНЬ, В.І. АНДРІЄНКО, Л.Л. МАЦЕВИЧ, І.С. КАРПОВА,
Л.Л. ЛУКАШ

Інститут молекулярної біології і генетики НАН України
Україна, 03143, Київ, вул. Заболотного, 150,
e-mail: lukash@imbg.org.ua

Мета. Порівняти вплив ізолектинів квасолі звичайної (*Phaseolus vulgaris*), сумарного препарату та його окремих ізоформ, на проліферацію, виживання та індукцію апоптозу у культурі клітин ссавців. **Методи.** Використовувався метод оцінки цитотоксичності/мітогенності за допомогою мікрокультурального тесту, та метод оцінки апоптозу шляхом забарвлення флюоресцентними барвниками. **Висновки.** Досліджено вплив фітогемаглютиніну та його окремих ізоформ на проліферацію та апоптоз клітин різного видового походження в умовах *in vitro*. Показано, що лектини здатні дозозалежно впливати на проліферацію клітин, а також індукувати апоптоз. При високих концентраціях досліджуваних білків спостерігали пригнічення проліферації клітин та індукцію апоптозу та виявляли клітини на різних стадіях апоптозу.

Ключові слова: фітогемаглютинін, ізолектини, проліферація, апоптоз, культура клітин *in vitro*.

Вступ. Відомо, що вуглевод-білкові взаємодії лежать в основі багатьох біологічних процесів, і саме тому лектини широко використовують для вирішення цілої низки фармакологічних, біотехнологічних, гістологічних та інших питань біології. Широке застосування лектинів на практиці спонукає і розвиток фундаментальних досліджень у цій галузі. Актуальними стають роботи із вивчення впливу цієї групи білків на мутаційний процес та репарацію, проліферацію та апоптоз [1–3].

Раніше нами було показано здатність деяких лектинів рослинного та тваринного походження дозозалежно впливати на проліферацію клітин ссавців та індукувати апоптичні зміни [4]. І хоча для поодиноких лектинів описано лектиноасоційовані ензиматичні активності [5], завдяки яким вони здатні безпосередньо взаємодіяти з макромолекулами у клітині, більшість із них все ж таки реалізує свою активність опосередковано, через взаємодію з вуглеводними детермінантами на поверхні клітинної мембрани. Тож вуглеводна специфічність лектину, його молекулярна будова, ймовірно, є вирішальними для реалізації мітогенної чи цитотоксичної дії цієї групи білків.

Мітогенну активність фітогемаглютиніну відкрито на початку 60-х років ХХ століття. Нині цей білок активно застосовують для реакції бласттрансформації при цитогенетичних дослідженнях. За своєю структурою сумарний препарат фітогемаглютиніну (ФГА-Р) містить суміш різних ізолектинів. Ізолектини, ФГА-Е

© Т.О. КОЧУБЕЙ, О.О. ПІВЕНЬ, В.І. АНДРІЄНКО, Л.Л. МАЦЕВИЧ, І.С. КАРПОВА, Л.Л. ЛУКАШ, 2012

– еритроцитарна форма та ФГА-L -лейкоцитарна форма, за своєю структурою є тетрамерами, що складаються з E- та L-субодиниць, молекулярна маса яких становить 36 та 34 кДА відповідно [6]. Сумарний препарат ФГА-Р має вуглеводну специфічність до олігосахаридів, окремі ізоформи, наприклад, лейкоцитарна – до вуглеводів, що містять манозу, на відміну від еритроцитарної, що має вуглеводну специфічність до глікопротеїнів [7]. Також показано, що лейкоцитарна ізоформа ФГА-L, на відміну від еритроцитарної, 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 [8].

Метою даної роботи було порівняти вплив ізолектинів квасолі звичайної (*Phaseolus vulgaris*), сумарного препарату та його окремих ізоформ, на проліферацію, виживання та індукцію апоптозу у культурі клітин ссавців; виявити можливу залежність їхньої цитотоксичної або мітогенної активності від концентрації, динаміки та вуглеводної специфічності сумарного препарату ФГА-Р та його окремих ізоформ.

Матеріали і методи

Досліджували дію комерційних препаратів лектинів квасолі звичайної *Phaseolus vulgaris* – фітогемаглютинін ФГА (“ЛЕКТИНОТЕСТ”, Львів). Цитотоксичну дію білків вивчали із застосуванням мікрокультурального тесту [9]. Як модельну тест-систему використовували лінію клітин раку гортані людини Нер-2, лінію спонтанно трансформованих клітин китайського хом’ячка *B1ld-ii-FAF28C1237-8Glu-tsIII* та отриману у нашому відділі лінію фібробластів людини 4BL. Клітини культивували у стандартному ростовому середовищі Ігла (MEM, Sigma, USA) з 5 %

ембріональної сироватки великої рогатої худоби (Sigma, USA) та антибіотиками.

Для мікрокультурального тесту клітини висівали у 96-лунковий планшет стандартно [9]. Через 24 год клітини обробляли водними розчинами досліджуваних лектинів у діапазоні концентрацій від 0,01 до 1000 мкг/мл. Обробка клітин лектинами тривала 4 год. Як негативний контроль застосовували мітоміцин С у концентрації 10 мкг/мл. Фіксацію, забарвлення клітин та обрахування оптичної щільності у дослідних та контрольних варіантах виконували як описано раніше [10].

Кількісне визначення життєздатності клітин та апоптозного індексу здійснювали за допомогою фарбників акридинового оранжевого та етидіуму броміду, котрі готували згідно методики [11]. Клітини обробляли досліджуваними лектинами у концентрації 100 мкг/мл та 1 мкг/мл протягом 4 та 12 год. При дослідженні апоптозу як позитивний контроль використовували N-метил-N'-нітро-N-нітрозогуанідин (МННГ) у концентрації 5 мкг/мл. Обробка клітин цим агентом тривала 1 год. Препарати аналізували під мікроскопом зі збільшенням 90x, із комбінацією фільтрів, що підходять для збудження флуоресценції. Аналізували три типи клітин: живі клітини – з нормальним ядром, що мали яскраво-зелений хроматин з організованою структурою; клітини на ранній стадії апоптозу – яскраво-зелений або жовтий хроматин, який сильно конденсований, або фрагментований; клітини на пізній стадії апоптозу – яскраво-помаранчовий хроматин. За кількісними даними вираховували апоптозний індекс [11].

Результати та обговорення

Вплив лектинів на проліферацію клітин ссавців. Відомо, що ФГА широко застосовують як мітоген для індукції бласттрансформації лімфоцитів крові людини, але вплив цього білка та його окремих ізо-

форм на проліферацію соматичних клітин ссавців іншого типу не достатньо вивчений. Тому свої дослідження ми почали з тестування впливу ФГА-Р та його ізоформ на проліферацію різних типів клітин ссавців. У експерименті використовували широкий діапазон концентрацій досліджуваних білків – від 0,01 до 1000 мкг/мл. Порівнювали дію лектинів з використанням трьох різних модельних систем: лінія фібробластів китайського хом'ячка; лінія злоякісних клітин раку гортані людини Нер-2; лінія фібробластів людини 4BL. В усіх трьох використаних тест-системах досліджувані препарати впливали на проліферацію клітин та цитостатичну активність залежно від концентрації лектинів (рис. 1-3).

При високих концентраціях (100–1000 мкг/мл) спостерігали статистично достовірне зниження кількості клітин під дією ФГА-Р та його ізоформ. При нижчих концентраціях препаратів ефект інгібуючої/цитостатичної дії білків послаблюється (рис. 1), в окремих випадках спостерігали високу мітогенну активність (рис. 2, 3).

Варто зауважити, що характер біологічної дії трьох препаратів відрізнявся залежно від обраної тест-системи.

Так, на моделі культури клітин Нер-2 досліджувані нами білки не виявляли мітогенної активності, на відміну від дослідів з використанням клітин китайського хом'ячка та 4BL. Також відрізнялись ефекти дії окремих ізоформ та сумарного препарату. Так, у культурах клітин людини (рис. 1,3) най-

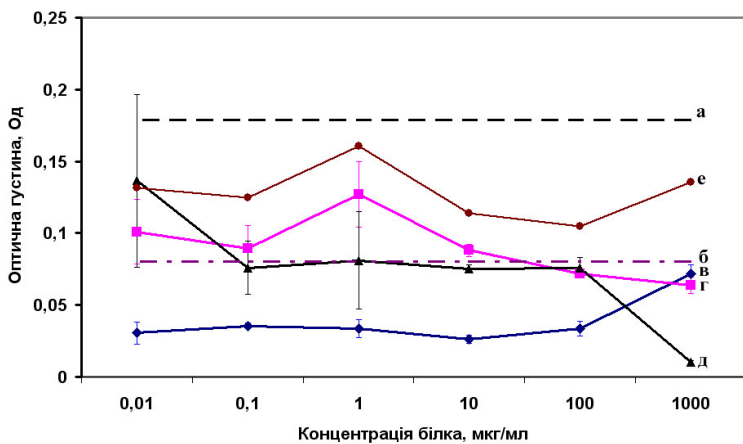


Рис. 1. Вплив сумарного препарату ФГА та його субодниць на проліферацію клітин раку гортані Нер2: а – контроль; б – мітоміцин С; в – лейкоцитарна ізоформа ФГА; г – еритроцитарна ізоформа ФГА; д – сумарний препарат лектину; е – теоретично очікувана дія сумарного препарату при умові незалежної сумарної дії обох його субодниць

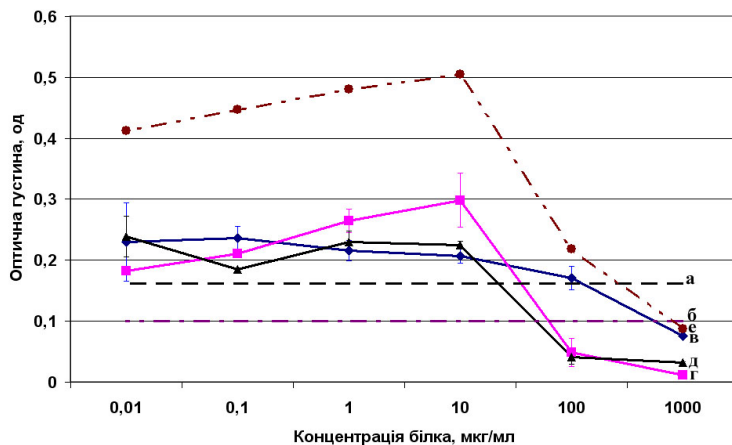


Рис. 2. Вплив сумарного препарату ФГА та його ізолектинів на проліферацію клітин китайського хом'ячка: а – контроль; б – мітоміцин С; в – лейкоцитарна ізоформа ФГА; г – еритроцитарна ізоформа ФГА; д – сумарний препарат лектину; е – теоретично очікувана дія сумарного препарату при умові незалежної сумарної дії обох його субодниць

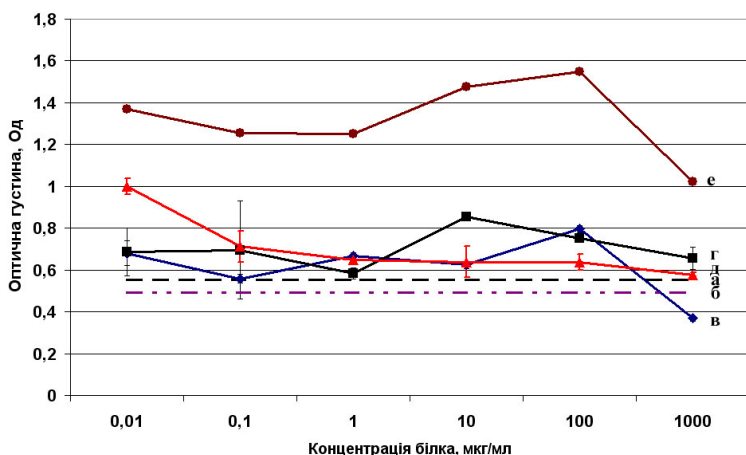


Рис. 3. Вплив сумарного препарату ФГА та його ізолектинів на проліферацію культури клітин 4BL: а – контроль; б – мітоміцин С; в – лейкоцитарна ізоформа ФГА; г – еритроцитарна ізоформа ФГА; д – сумарний препарат лектину; е – теоретично очікувана дія сумарного препарату при умові незалежної сумарної дії обох його субодиниць

більш яскраво виражений цитостатичний/інгібуючий ефект виявляла лейкоцитарна ізоформа, а у культурі клітин китайського хом'ячка – еритроцитарна ізоформа та сумарний препарат. Можливо, такі відмінності у біологічній активності сумарного препарату та його ізоформ можна пояснити різною вуглеводною специфічністю білків та відмінностями глікокоду різних типів клітин.

Зважаючи на те, що і сумарний препарат, і окремі ізоформи 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 субодиниць, лейкоцитарної та еритроцитарної, 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. 1–3) за умов незалежної ади-

тивної дії обох його субодиниць свідчить на користь припущення про конкуренцію еритроцитарної та лейкоцитарної ізоформ за умов експерименту. Дійсно можливо, що молекули двох субодиниць ФГА конкурують за мішені – вуглеводні детермінанти на поверхні клітинної мембрани. Але таке припущення потребує подальших молекулярно-біологічних досліджень.

Дослідження індукції апоптозу сумарним препаратом

ФГА та його ізоформами. Оскільки при дослідженні впливу лектинів на проліферацію клітин ссавців в умовах *in vitro* ми спостерігали статистично вірогідне зменшення кількості клітин після їхньої обробки білками у високих концентраціях, ми висунули припущення про здатність досліджуваних білків індукувати апоптоз за даних умов експерименту. Як відомо з літературних даних, деякі лектини дійсно здатні спричинити апоптоз, опосередковано активуючи певні сигнально-регуляторні шляхи клітини [11]. Для перевірки нашого припущення ми провели серію дослідів з використанням білків у концентраціях 1 та 100 мкг/мл, кількісне визначення життєздатності клітин та апоптозного індексу проводилось відразу та через 12 год після обробки, згідно методики [12].

В усіх дослідних варіантах спостерігали живі клітини з яскраво зеленими ядрами (рис. 4,а), клітини на ранній стадії апоптозу – ядро з жовтими включеннями, або жовте (рис. 4,б) та мертві клітини з помаранчевим ядром (рис. 4,в).

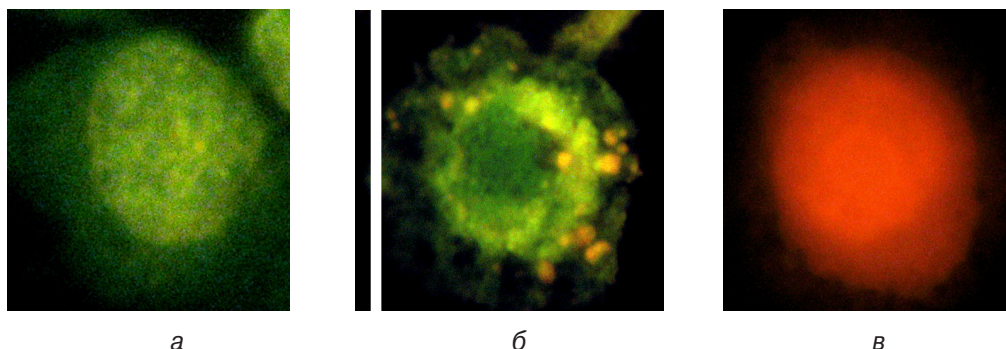


Рис. 4. Індуція апоптотичних змін у культурі клітин раку гортані Нер2: а – живі клітини (яскраво-зелений хроматин з організованою структурою); б – клітини на ранній стадії апоптозу (яскраво-зелений або жовтий хроматин, який сильно конденсований або фрагментований); в- клітини на пізній стадії апоптозу (яскраво-помаранчевий хроматин). Клітини обробляли лейкоцитарною ізоформою ФГА у концентрації 1 мкг/мл (збільшення 90х)

При дослідженні впливу сумарного препарату ФГА-Р та ізоформ, ФГА-Е і ФГА-Л на частоту апоптотичних клітин при використанні лінії Нер-2 нами було показано, що

обробка білками у концентрації 1мкг/мл зменшувала кількість живих клітин, порівняно з контролем (рис.5).

Найвищу частоту апоптотичних клітин

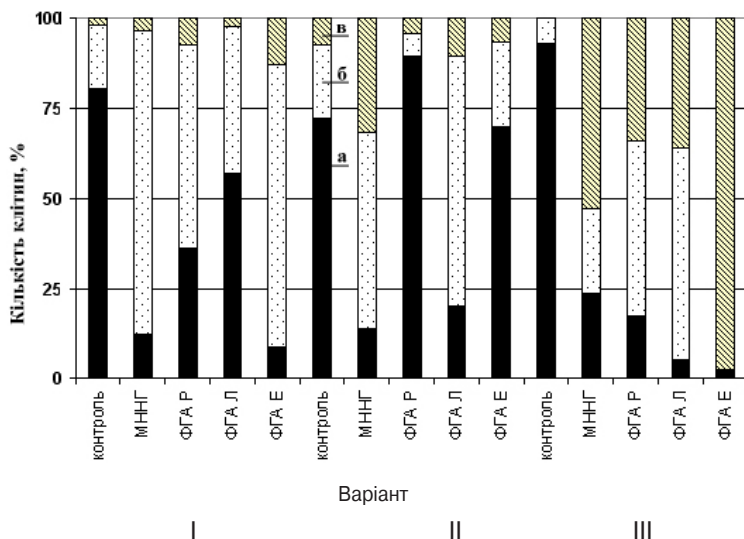


Рис. 5. Індуція апоптотичних клітин сумарним препаратом ФГА та його ізоформами за умов різних варіантів обробки у культурі клітин Нер2. Варіант I – концентрація досліджуваних білків становила 1 мкг/мл, врахування частоти апоптотичних клітин проводили відразу після обробки; Варіант II – концентрація досліджуваних білків становила 1 мкг/мл, врахування частоти апоптотичних клітин проводили через 14 годин після обробки; Варіант III – концентрація досліджуваних білків становила 100 мкг/мл, врахування частоти апоптотичних клітин проводили відразу після обробки; на діаграмі позначено: а – живі клітини; б – клітини на стадії раннього апоптозу; в – клітини на стадії пізнього апоптозу. Розподіл частот живих та апоптотичних клітин для усіх дослідних варіантів вірогідно відрізнявся від контролю (рівень значимості $p < 0,05$ – $p < 0,001$, в залежності від варіанта)

спостерігали після дії еритроцитарної ізоформи – 92,13%, що можна співставити з дією МННГ – 92,57 %. Менш активним індуктором підвищення частоти апоптотичних клітин була лейкоцитарна ізоформа – 43,24 %. За впливом на апоптоз сумарний препарат займав проміжне місце порівняно з дією ізоформ.

Аналізуючи частоту живих та апоптотичних клітин при обробці досліджуваними лектинами у концентрації 1мкг/мл через 12 год після обробки, з'ясували, що біологічна активність ізоформ мала дещо інший характер, порівняно з попереднім дослідом (рис. 5, вар. II). Так,

не було виявлено статистично вірогідних відмінностей між частотами апоптичних клітин у контролі та в культурах, що були оброблені еритроцитарною ізоформою. В той же час, лейкоцитарна ізоформа підвищувала частоту апоптозних клітин до рівня, що близький до ефекту, спричиненого МННГ – 79,71 %, на відміну від попереднього дослідю (рис.2, вар I). Вірогідно ($p < 0,001$) різнився від контрольного також і розподіл частот живих та апоптичних клітин після обробки сумарним препаратом: кількість живих клітин була навіть вищою, ніж у контролі – 89,29 %. Отримані дані узгоджуються з попередніми дослідженнями, де вивчали вплив ФГА-Р та його ізоформ на проліферацію клітин Нер-2 (рис.1), де також досліджували дію білків через 12 год після обробки.

При дослідженні впливу сумарного препарату та його ізоформ на частоту апоптичних клітин у концентрації 100 мкг/мл із використанням тієї ж тест-системи, нами було показано, що обробка усіма трьома білками статистично достовірно ($p < 0,001$) змінює розподіл частот живих та апоптозних клітин, підвищуючи частоту апоптичних клітин, порівняно з контролем. У випадку дії ізоформ відсоток живих клітин був нижчий, ніж при обробці модельним мутагеном МННГ; рівень значимості цих відмінностей також становив $p < 0,001$ (рис. 5). Варто також зауважити, що на відміну від двох попе-

редніх експериментів, у яких дію білків досліджували при низькій концентрації, у цьому дослідному варіанті спостерігали і тенденцію до зростання частоти клітин на стадії пізнього апоптозу. Таке спостереження свідчить на користь гіпотези про концентраційну залежність при реалізації біологічної дії досліджуваних білків та узгоджується з результатами досліджень впливу білків на проліферацію клітин *in vitro* (рис.1).

При індукції апоптозу у культурі клітин китайського хом'ячка показано, що при концентрації 1 мкг/мл сумарний препарат та лейкоцитарна ізоформа статистично достовірно ($p < 0,001$) індукували підвищення частоти апоптичних клітин лише одразу після обробки (рис.6).

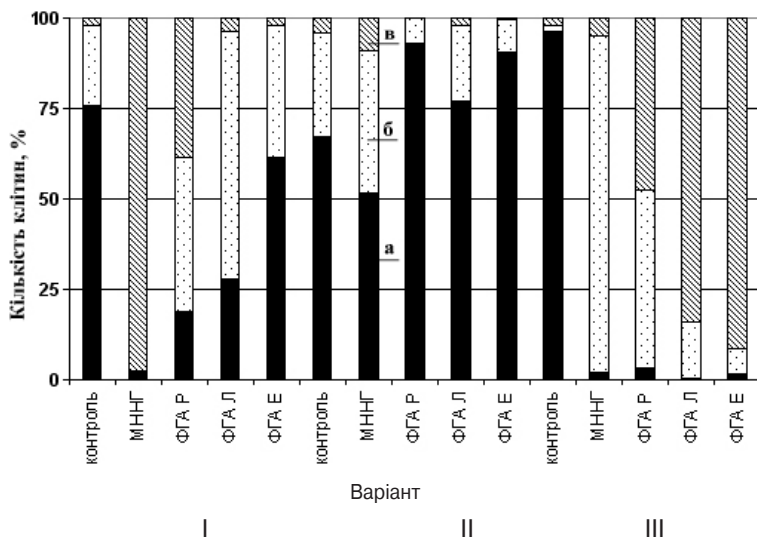


Рис. 6. Індукція апоптозних клітин сумарним препаратом ФГА та його ізоформами за умов різних варіантів обробки у культурі клітин китайського хом'ячка. Варіант I – концентрація досліджуваних білків становила 1 мкг/мл, врахування частоти апоптозних клітин проводили відразу після обробки; Варіант II – концентрація досліджуваних білків становила 1 мкг/мл, врахування частоти апоптозних клітин проводили через 14 годин після обробки; Варіант III – концентрація досліджуваних білків становила 100 мкг/мл, врахування частоти апоптозних клітин проводили відразу після обробки. На діаграммі позначено: а – живі клітини; б – клітини на стадії пізнього апоптозу. Розподіл частот живих та апоптичних клітин для усіх дослідних варіантів вірогідно відрізнявся від контролю (рівень значимості не менш, ніж $p < 0,05$)

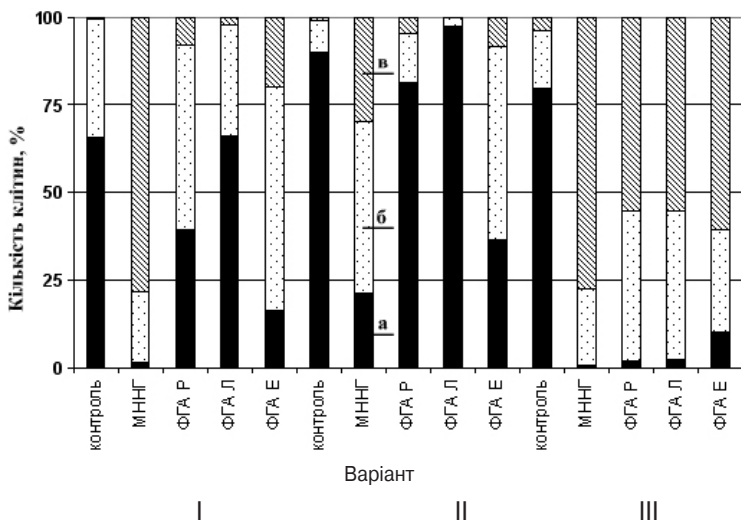


Рис. 7. Індукція апоптозних клітин сумарним препаратом ФГА та його ізоформами за умов різних варіантів обробки у культурі клітин 4BL. Варіант I – концентрація досліджуваних білків становила 1 мкг/мл, врахування частоти апоптозних клітин проводили відразу після обробки; Варіант II – концентрація досліджуваних білків становила 1 мкг/мл, врахування частоти апоптозних клітин проводили через 14 годин після обробки; Варіант III – концентрація досліджуваних білків становила 100 мкг/мл, врахування частоти апоптозних клітин проводили відразу після обробки; на діаграммі позначено: а – живі клітини; б – клітини на стадії раннього апоптозу; в – клітини на стадії пізнього апоптозу

Через 12 годин після обробки, розподіл частот також вірогідно відрізнявся від контрольних показників ($p < 0,001$), однак характер розподілу був зовсім іншим. Так, ані сумарний препарат, ані окремі ізоформи ФГА не лише не спричиняли зростання частоти апоптичних клітин, але, навпаки, такі клітини зустрічались рідше, ніж у контрольних варіантах. 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 на стадії раннього апоптозу гинуть, вочевидь більшість з них репарується та активно проліферує.

При дослідженні дії білків у концентрації 100 мкг/мл спостерігали статистично достовірне ($p < 0,001$) зниження частоти живих клітин порівняно з контролем (рис.6,

вар III). Найвищу частоту апоптичних клітин спостерігали при обробці лейкоцитарною ізоформою. Також варто зауважити, що серед апоптичних клітин переважала частка клітин на стадії пізнього апоптозу. Розподіл частот живих та апоптозних клітин відрізнявся від такого у препаратах, оброблених еритроцитарною ізоформою та сумарним білком, на рівні значимості $p < 0,001$.

Із використанням культури клітин людини 4BL як модельного об'єкту, показано, що при концентрації білка 1 мкг/мл еритроцитарна ізоформа змінювала

розподіл частот живих та апоптичних клітин (рівень значимості відмінностей становив $p < 0,001$). При цьому спостерігали зростання частоти апоптичних клітин як відразу, так і через 12 год після обробки (рис. 7).

Обробка сумарним препаратом у концентрації 1мкг/мл через 12 год лише незначно зменшувала кількість живих клітин у культурі, порівняно з контролем, а у культурах, оброблених лейкоцитарною ізоформою, частота живих клітин навіть дещо зростала (рівень значимості відмінностей розподілу частот становив $p < 0,001$). Варто зауважити, що розподіл частот живих та апоптозних клітин відразу після обробки лейкоцитарною ізоформою ФГА мало відрізнявся від контрольного: кількість живих клітин була на рівні контролю, і лише співвідношення клітин на ранніх та пізніх стадіях апоптозу дещо змістилося в бік цих

останніх ($p < 0,05$). При концентрації досліджуваних білків 100 мкг/мл, як і у попередніх дослідях, спостерігали статистично достовірну індукцію частоти апоптозних клітин усіма досліджуваними лектинами ($p < 0,001$).

Цікаво, що вплив досліджуваних ізоформ лектину на клітини різного походження *in vitro* дещо різнився. Так, після обробки сумарною та лейкоцитарною формами лектинів в концентрації 1 мкг/мл в культурі клітин китайського хом'ячка спостерігали достовірно вищий рівень апоптозу, ніж в культурі Нер-2; в той же час після обробки еритроцитарною формою спостерігали цілком протилежну картину.

Достовірно різнився і вплив лектинів на культури 4BL та китайського хом'ячка після обробки білком у концентрації 1 мкг/мл із подальшою постінкубацією. У клітинах китайського хом'ячка сумарна та еритроцитарна форми лектину спричиняли зміну розподілу частот живих та апоптичних клітин у бік живих, – в той же час у культурі 4BL після такої обробки сумарною та еритроцитарною формами лектину спостерігалось, навпаки, помітне зниження частоти живих клітин. Після обробки ж лейкоцитарною формою, навпаки, в культурі 4BL спостерігали достовірно зростання частот живих клітин, а в культурі китайського хом'ячка – незначне її зниження. Отримані нами 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 білків, або відсутність індукції апоптозу, окрім дії лейкоцитарної форми, у культурі клітин раку гортані (рис. 5). 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 на стадії раннього апоптозу, 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 клітини на стадії пізнього апоптозу, на відміну від дослідів, де білки використовувались при низьких концентраціях.

Висновки

Показано, що сумарний препарат ФГА та його окремі ізоформи мають дозозалежний характер впливу на проліферацію клітин та впливають на частоту апоптозу. Можливо, ізоформи ФГА конкурують за одні й ті ж самі мішені, а дія сумарного препарату є результатом такої конкуренції. У подальшому плануємо детальніше дослідити сигнально-регуляторні механізми індукції апоптозу лектинами, оскільки такі дані цікаві з точки зору фундаментальної біології та можуть бути перспективними при розробці нових методів таргетної терапії злоякісних утворень.

Перелік літератури

1. Лукаш Л.Л., Карпова І.С., Мирошниченко О.С. і др. Влияние лектина соцветий *Sambucus nigra* на спонтанный и индуцированный алкилирующим агентом мутагенез в соматических клетках млекопитающих // Цитология и генетика. – 1997. – Т.31, №5. – С. 52 – 60.
2. Карпова І.С., Корецька Н.В. Дослідження модифікуючого впливу лектинів на токсичність і мутагенність іонів Ni(II) в культурі *Bacillus subtilis* // Біополімери і клітина. – 2003. – Т.19, № 3. – С.224 – 230.
3. Пивень О.О., Лукаш Л.Л. Влияние экзогенных белков на мутационный процесс // Цитология и генетика. – 2011. – Т.45, № 1. – С.68 – 79.
4. Коваленко О.О., Лукаш Л.Л. Індукція апоптозу у популяцій клітин ссавців *in vitro* під впливом лектинів // Цитология и генетика. – 2007. – Т. 41, № 5. – С. 48 – 53.

5. 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.1493–506.
6. Miller I.B., Hsu R., Heinrikson R. et al. 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.
7. Антонюк В.О. Лектини та їх сировинні джерела. Львів: Кварт – 2005. – 554 с.
8. Yamamoto H., Swoger J., Greene S. et al. 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.
9. Лукаш Л.Л., Патон Е.Б., Сухорада Е.М и др. Оценка цитотоксичности препаратов с антиканцерогенным действием в культурах клеток человека //Цитология и генетика. – 1997. – Т. 31, №6. – С. 26 – 34.
10. Кочубей Т.О., Пивень О.О., Карпова І.С., та ін. Дослідження впливу сумарного препарату ФГА та його субодниць на проліферацію, виживання та апоптоз клітин різного видового походження в умовах *in vitro* //Актуальні проблеми акушерства і гінекології, клінічної імунології та медичної генетики.– Київ-Луганськ, 2010.– Вип. 19.– С. 250–257.
11. McGanon A.J., Martin S.J., Bissonnette R.P. et al. 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. Pres Inc “Cell Death”. – 1995. – Vol. 46. – P 172–173.
12. Boettne D., Huston C., Petri W. Galactose/N-acetylgalactosamine lectin: the coordinator of host cell killing// J. Biosci.– 2002.– Vol.27, № 6, Suppl.3. – P. 553–557.

Представлено М.А. Пілінською
Надійшла 20.03.2012

ВЛИЯНИЕ ФИТОГЕМАГГЛЮТИНИНА *PHASEOLUS VULGARIS* И ЕГО ИЗОФОРМ НА ПРОЛИФЕРАЦИЮ И ВЫЖИВАНИЕ КЛЕТОК МЛЕКОПИТАЮЩИХ *IN VITRO*

Т.А. Кочубей, О.А. Пивень, В.И. Андриенко,
Л.Л. Мацевич, И.С. Карпова, Л.Л. Лукаш

Институт молекулярной биологии и генетики НАН
Украины,
Украина, 03143, Киев, ул. Заболотного, 150,
e-mail: lukash@imbg.org.ua

Цель работы. Сравнить влияние изолектинов фасоли обыкновенной (*Phaseolus vulgaris*), суммарного препарата и его отдельных изо-

форм на пролиферацию, выживание и индукцию апоптоза в культуре клеток млекопитающих. **Методы.** Использовался метод оценки цитотоксичности/митогенности с помощью микрокультурального теста, и метод оценки апоптоза путем окраски флуоресцентными красителями. **Выводы.** Исследовано влияние фитогемагглютинаина и его отдельных изоформ на пролиферацию и апоптоз клеток разного видового происхождения в условиях *in vitro*. Показано, что лектины способны дозозависимо влиять на пролиферацию, а также индуцировать апоптоз. При высоких концентрациях исследуемых белков наблюдали подавление пролиферации клеток и индукцию апоптоза, регистрировали клетки как на ранней, так и на поздней стадии апоптоза.

Ключевые слова: фитогемагглютинин, изолектины, пролиферация, апоптоз, культура клеток *in vitro*.

INFLUENCE OF *PHASEOLUS VULGARIS* PHYTOHEMAGGLUTININ AND ITS ISOFORMS ON THE PROLIFERATION AND SURVIVAL OF MAMMALIAN CELLS *IN VITRO*

T.O. Kochubei, O.O. Piven, V.I. Andrienko,
L.L. Macewicz, I.S. Karpova, L.L. Lukash

Institute of Molecular Biology and Genetics NAS
Ukraine
150 Zabolotnogo Street, Kyiv, 03143 Ukraine
e-mail: lukash@imbg.org.ua

Aim. To compare the influence of kidney beans (*Phaseolus vulgaris*) isolectins, total protein and its individual isoforms on proliferation, survival and apoptosis induction in mammalian cell culture. **Methods** The method of cytotoxicity/mitogenicity evaluation by microculture test and apoptosis testing by fluorescent dyes were used. **Conclusions.** The influence of phytohemagglutinin and its individual isoforms on proliferation and apoptosis of different origin cells *in vitro* was investigated. It was shown that all lectins studied can affect the cells proliferation in dose-dependent mode and induce the apoptosis. At high levels of the proteins examined there was observed inhibition of cell proliferation, induction of apoptosis with cells being on its various stages.

Key words: phytohemagglutinin, isolectins, proliferation, apoptosis, cell culture *in vitro*.