

Біологічна активність деяких білків та їхнє використання для модуляції процесів індукованого мутагенезу в соматичних клітинах ссавців *in vitro*

Л. Л. Мацевич, О. М. Сухорада, Л. Л. Лукаш

Інститут молекулярної біології і генетики НАН України
Вул. Академіка Заболотного, 150, Київ, 03143, Україна

Порівнювали вплив лектинів суцвіть і кори бузини чорної, а також інсуліну на проліферацію культури клітин китайського хом'яка. Для одного з цих білків, а саме — лектину кори стовбура бузини чорної виявлено протекторні властивості стосовно процесів індукованого мутагенезу.

Вступ. Досліджували два аспекти біологічної активності лектинів бузини чорної: їхній вплив на проліферацію клітин *in vitro* та здатність до модуляції процесів індукованого мутагенезу для з'ясування можливості використання цих білків як генепротекторних речовин.

На сьогодні основні напрямки вивчення та застосування лектинів пов'язані з їхньою здатністю до специфічного зв'язування з рецепторами цитомембрани; цим, зокрема, обумовлене їхнє використання з діагностичною метою [1, 2]. Характерною рисою багатьох лектинів є висока токсичність для ссавців, але існують і порівняно низькотоксичні білки, які також належать до групи лектинів. Саме останні є привабливим об'єктом щодо застосування їх для модифікації біологічних (у тому числі генетичних) властивостей інших сполук. Це, зокрема, лектин кори бузини чорної: одна з переваг цього білка полягає в тому, що він практично не накопичується у клітині (швидко деградує) [3].

Вибір сполук нікелю як основного модельного мутагену пов'язаний з тим, що сполуки важких металів є одним із найрозповсюдженіших хімічних факторів професійного ризику в умовах сучасної промисловості, а також значним забруднювачем довкілля. Для сполук нікелю показано цитоток-

сичні [4] та канцерогенні властивості [5]. Надлишок нікелю у клітині призводить також до патологічних біохімічних змін [6].

За існуючими літературними даними, нікель і його сполуки здатні індукувати мутації як *in vivo* [4, 7—12], так і *in vitro*. В останньому випадку результати неоднозначні, особливо для хлориду нікелю [13—15]. Ймовірно, мутагенні властивості цієї солі значною мірою залежать від умов культивування [16, 17].

На рівні первинних пошкоджень показано індукцію іонами Ni^{2+} одностранных розривів ДНК та крос-лінків [8, 12, 18—20]. Крім того, склад мікроелементів в організмі є збалансованим [21], тому зростання вмісту іонів Ni^{2+} порушуватиме рівновагу у клітині, що може впливати на рівень стабілізації структури ДНК.

Багатьма дослідниками виявлено значні міжіндивідуальні відмінності індукції мутацій сполуками нікелю. Тому питання про мутагенну дію важких металів та механізми захисту від неї залишаються актуальними, особливо в контексті розробки підходів до тестування індивідуальної чутливості та підбору конкретних доз захисних факторів.

Матеріали і методи. У роботі використано культивовану лінію клітин Bld-ii-FAF28C127. Застосовано метод мікрокультивування для визначення цитотоксичної/мітогенної активності [22] та

Таблиця 1

Вірогідність впливу на ріст клітинної культури різних концентрацій досліджуваних білків

Варіант обробки	Концентрація, мкг/мл					
	0,063	0,125	0,25	0,5	1	2
Лектин кори бузини чорної	< 0,05	< 0,001	< 0,001	> 0,05	> 0,05	> 0,05
Інсулін	> 0,05	< 0,05	< 0,001	> 0,05	> 0,05	> 0,05
Лектин суцвіть бузини чорної	> 0,05	> 0,05	< 0,05	> 0,05	> 0,05	< 0,05

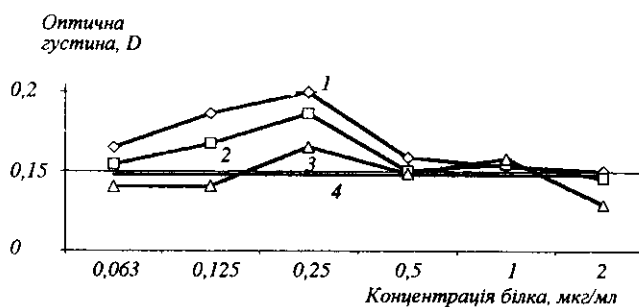


Рис. 1. Вплив досліджуваних білків на ріст клітинної культури: 1 — лектин кори; 2 — інсулін; 3 — лектин суцвіть; 4 — контроль

сomet-аналіз — для виявлення пошкодження хроматину окремих клітин [23, 24] з модифікаціями за [25]. Для виконання даної роботи потрібно було обрати зручний модельний мутаген. У зв'язку з цим протестовано дві сполуки з принципово різними механізмами дії: N-метил-N-нітро-N-нітрозогуанідин (МННГ) та хлорид нікелю.

Використовували два лектини бузини чорної (*Sambucus nigra*): комерційний лектин кори стовбура («Лектинотест», Львів) та лектин суцвіть (люб'язно наданий І. С. Карповою); а також інсулін свині (перекристалізований з фармацевтичного препарату).

Вірогідність різниці між контрольними та дослідними варіантами обчислювали за методом Ст'юдента. Для статистичної обробки отриманих даних застосовували також методи дисперсійного аналізу.

Результати і обговорення. Результати вивчення впливу досліджуваних білків на ріст культури наведено на рис. 1 та в табл. 1. Як видно, в низьких концентраціях має місце їхня стимулювальна дія на проліферацію клітинної культури. За високих концентрацій подібного ефекту не спостерігається, а у випадку лектину суцвіть *S. nigra*,

навпаки, відмічено вірогідне пригнічення проліферації. Показник впливу застосованої концентрації білків на інтенсивність росту культури становив $84,1 \pm 20,5$ % ($p < 0,001$), $60,1 \pm 51,6$ % ($p < 0,05$) та $67,3 \pm 42,3$ % ($p < 0,05$) відповідно для лектину кори, інсуліну та лектину суцвіть. Продемонстровано також наявність вірогідного ($p < 0,001$) впливу залежно від виду застосованого білка на ріст культури; відсоток впливу склав 21,1.

За раніше отриманими даними, досліджувані лектини у концентрації 0,2 мкг/мл проявляють також протекторну активність відносно мутагенного чинника МННГ [26].

У зв'язку з виявленою мітогенною дією лектинів кори і суцвіть досліджували також їхній ефект на ріст мікрокультур, попередньо оброблених мітоміцином С. Спочатку було протестовано цитостатичну дію мітоміцину за різних концентрацій у даній тест-системі. Показано пригнічення проліферації клітин у діапазоні концентрацій 1,25—40 мкг/мл, причому це пригнічення не мало дозозалежного характеру. Цікаво, що в межах концентрацій 1,25—40 мкг/мл не виявлено вірогідного впливу застосованої концентрації мітоміцину на інтенсивність проліферації, що дозволяє зробити висновок про повне інгібування клітинного ділення у використаній культурі вже в концентрації 1,25 мкг/мл.

У досліді з модифікації впливу мітоміцину С на ріст клітинної культури за допомогою лектинів кори і суцвіть *S. nigra* концентрація мітоміцину становила 10 мкг/мл (рис. 2).

Як видно з рис. 2, передобробка мітоміцином (10 мкг/мл) значною мірою нівелює мітогенний ефект лектинів. Проте максимально активна концентрація лектину кори (0,25 мкг/мл) вірогідно стимулює ріст клітинної культури порівняно з мітоміциновим контролем. Для лектину суцвіть ві-

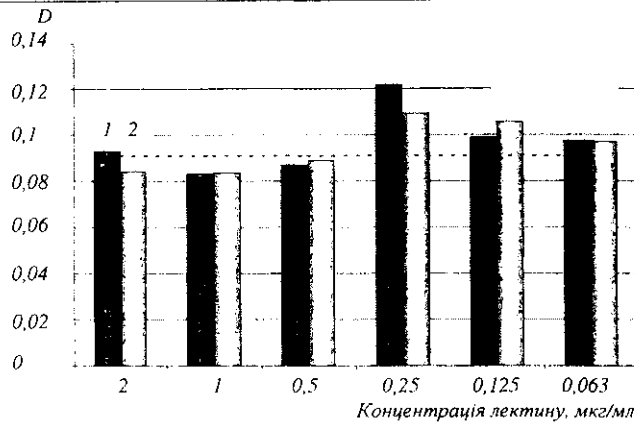


Рис. 2. Мітогенна дія лектинів бузини чорної у культурах з повністю пригніченою проліферацією: 1 — мітоміцин + лектин кори; 2 — мітоміцин + лектин суцвіть; пунктиром позначено мітоміциновий контроль

Таблиця 2
Результати дисперсійного аналізу впливу концентрації лектинів бузини чорної на ріст культур, оброблених мітоміцином С (10 мкг/мл)

Білок	Показник впливу, %	p
Лектин кори бузини чорної	35	< 0,05
Лектин суцвіть бузини чорної	31	> 0,05

рогідної стимуляції росту попередньо оброблених мітоміцином культур не виявлено, проте спостерігалася певна тенденція до такої стимуляції в концентрації білка 0,125 мкг/мл (значення критерію Ст'юдента 2,4 порівняно із стандартним 2,8). Дисперсійний аналіз отриманих даних також показав наявність вірогідного впливу концентрації лектину кори на ріст клітинної культури, попередньо обробленої мітоміцином С (табл. 2).

Для дослідження модулювальної дії лектину на утворення первинних пошкоджень ДНК також обирали модельний мутаген. Тестували алкілувальний агент МННГ та хлорид нікелю (рис. 3).

Літературні дані щодо мутагенних властивостей водорозчинних солей нікелю є досить суперечливими. Проте раніше нами опрацьовано оптимальний метод індукції первинних пошкоджень ДНК подібними солями у використовуваній тест-системі [16]

Оскільки, як показано вище, порівняно високі концентрації досліджуваних лектинів не лише не

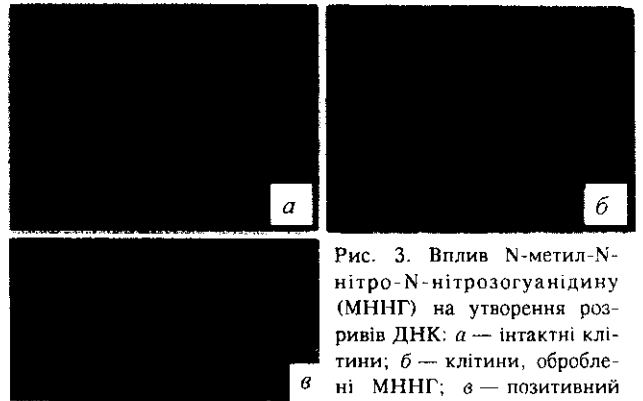


Рис. 3. Вплив N-метил-N-нітро-N-нітрозогуанідину (МННГ) на утворення розривів ДНК: а — інтактні клітини; б — клітини, оброблені МННГ; в — позитивний контроль

стимулюють, а навіть до певної міри пригнічують проліферацію клітинної культури, ми вивчали індукцію цими білками первинних пошкоджень ДНК.

Застосування методу DNA-comet виявило наявність індукції таких пошкоджень, починаючи уже з концентрації білка 0,5 мкг/мл (для лектину кори); у разі лектину суцвіть досліджували лише дві концентрації — 0,2 та 2 мкг/мл; перша з них не спричиняла пошкоджень, тоді як друга призводила до появи значної кількості розривів ДНК (рис. 4, а).

Хоча розроблена нами раніше модельна система для вивчення модулювальної дії біологічно активних чинників передбачає експериментальну обробку клітин у присутності сироватки, виникла також необхідність аналізу генетичної активності лектину саме в цій системі. Результати наведено на рис. 4, б. Як видно, порогова концентрація білка лишається незмінною, проте змінюється характер розподілу кількості пошкоджень на клітину в популяції.

У подальших дослідах вивчали модулювальний вплив лектину кори бузини чорної на індукцію пошкоджень ДНК модельним мутагеном NiCl₂. Для цієї серії дослідів обрано концентрацію білка 0,2 мкг/мл. За такої концентрації білок проявляє мітогенні властивості і, як показано раніше, протекторний вплив відносно цитотоксичної дії алкілувального агента МННГ (рис. 5).

Лектин кори бузини чорної проявляє виразну антагоністичну дію відносно іонів нікелю при будь-якій послідовності обробки клітин мутагеном і білком. Проте характер цієї антагоністичності відрізняється в окремих варіантах дослідів.

Так, за умов, коли обробку лектином проводили після експозиції клітин з мутагеном, спосте-

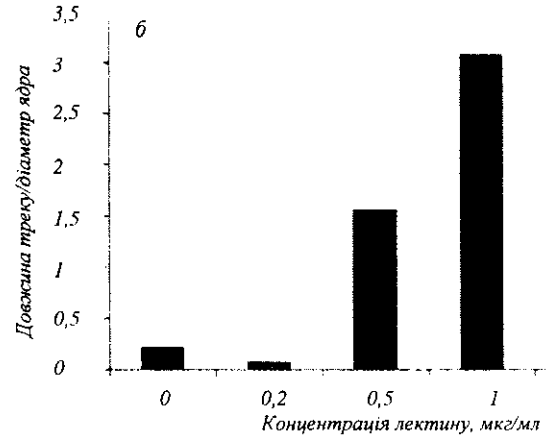
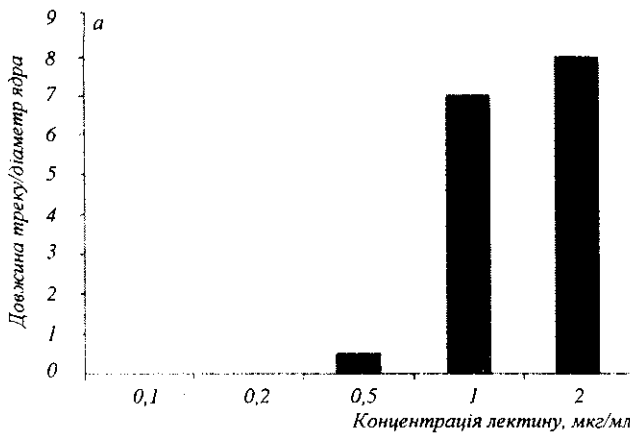


Рис. 4. Індукція розривів ДНК лектином кори бузини чорної у безсироватковому середовищі (а) та у присутності сироватки (б)

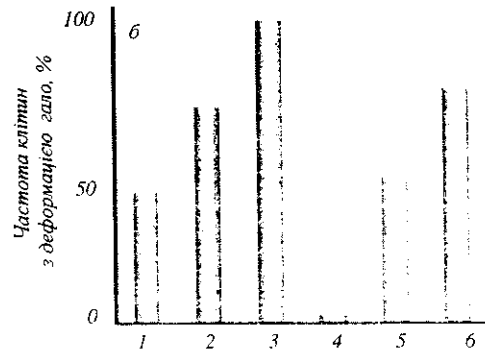
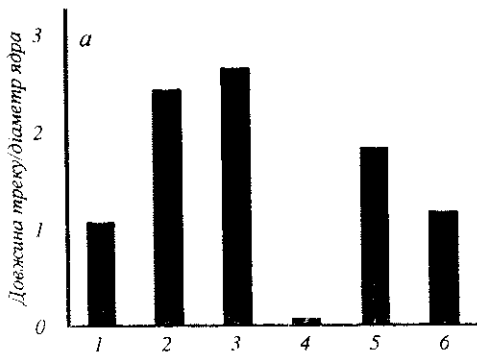


Рис. 5. Модуляція пошкоджуючої дії хлориду нікелю лектином кори бузини чорної: 1 — інтактні клітини; 2 — інкубація з NiCl₂ (1 год); постінкубація у середовищі без нікелю (3 год); 3 — інкубація з NiCl₂ (1 год); 4 — інкубація з лектином (3 год); інкубація з NiCl₂ (1 год); 5 — інкубація з NiCl₂ (1 год), інкубація з лектином (3 год); 6 — ко-інкубація з NiCl₂ та лектином

рігалося вірогідне зниження частоти появи клітин з пошкодженнями ДНК, але відмінностей між середнім показником деформації гало (тобто числом розривів на клітину) в дослідному варіанті та у відповідному позитивному контролі виявлено не було. Цікавим видається порівняння цих даних з результатами тестування генетичної активності лектину *per se*. Оскільки, за нашим припущенням, останні свідчать про наявність взаємодії лектину лише з частиною клітинної популяції, можна вважати за одну з імовірних гіпотез наявність репарації нікель-індукованих розривів у клітинах, які зв'язали лектин, тобто про репарогенні властивості даного білка. Дане припущення до певної міри підтверджується також тим, що за умов попередньої обробки клітин лектином як кількість розривів, так і частота клітин з деформацією гало спадають нижче контрольного рівня.

У разі інкубації клітин з лектином перед обробкою їх мутагеном спостерігається значне зниження як частки клітин з пошкодженнями ДНК, так і середнього числа нікель-індукованих розривів.

Це дозволяє припустити, що поряд з індукцією репаративних систем має місце також зменшення кількості іонів нікелю, які проникають до клітини. Повністю віднести згадане зменшення на рахунок неспецифічного зв'язування іонів нікелю лектином при даній схемі дослідження, на нашу думку, не можна, оскільки перед обробкою мутагеном лектин видаляли зі складу культурального середовища. Попереднє припущення підтверджується також результатами останнього дослідного варіанту — одночасної інкубації клітин з хлоридом нікелю і лектином. Тут спостерігається значне зниження кількості розривів ДНК у клітинах, проте за умов попередньої обробки клітин лектином число розривів знижується вірогідно сильніше. Повертаючись до дослідного варіанту з одночасною обробкою клітин сіллю нікелю і лектином, слід зауважити, що зниження частоти появи клітин з деформацією гало у даному випадку порівняно незначне, хоч і має вірогідний характер. На нашу думку, усе викладене вище свідчить про наявність виражених десмутагенних властивостей досліджуваного лектину, тобто в ре-

зультаті безпосередньої взаємодії іонів нікелю з лектином відбувається масове зв'язування цих іонів білковою молекулою.

Висновки. Лектини кори стовбура і суцвіть бузини чорної, а також інсулін у концентраціях 0,125—0,25 мкг/мл вірогідно стимулюють проліферацію клітинної культури, проте при збільшенні концентрації до 0,5 мкг/мл ці білки не проявляють мітогенних властивостей. Для лектину кори показано навіть пригнічення проліферації культури при застосуванні цього білка в концентрації 2 мкг/мл. Характер залежного від концентрації впливу для всіх досліджуваних білків відрізняється.

Лектин кори бузини чорної стимулює також ділення клітин у культурах з попередньо повністю пригніченою мітоміцином С проліферацією.

Досліджено індукцію первинних пошкоджень ДНК деякими низькомолекулярними сполуками. На основі отриманих результатів хлорид нікелю обрано як модельний мутаген для дослідження модуляції процесу мутагенезу за допомогою біологічно активних білків у даній тест-системі.

Лектин кори бузини чорної у концентрації 0,2 мкг/мл поряд з вираженими мітогенними властивостями має здатність знижувати кількість індукованих модельним мутагеном первинних пошкоджень ДНК.

L. L. Macewicz, O. M. Suhorada, L. L. Lukash

Biological activity of some proteins and their usage for modulation of induced mutagenesis in mammalian somatic cells *in vitro*

Summary

The influence of some proteins, such as elderberry bark and inflorescences lectins, and insulin, on cell culture proliferation, was compared. The antimutagenic properties for one of those proteins (elderberry bark lectin) were demonstrated.

Л. Л. Мацевич, Е. М. Сухорада, Л. Л. Лукаш

Биологическая активность некоторых белков и использование их для модуляции процессов индуцированного мутагенеза в соматических клетках млекопитающих *in vitro*

Резюме

Сравнивали влияние ряда белков (лектины коры и соцветий бузины черной, инсулин) на пролиферацию клеточной культуры. Для одного из этих белков выявлены протекторные свойства в отношении процессов индуцированного мутагенеза.

ПЕРЕЛІК ЛІТЕРАТУРИ

1. Lis H., Sharon N. Lectins: Carbohydrate-specific proteins that mediate cellular recognition // *Chem. Rev.*—1998.—98.—P. 637—674.

2. Battelli M., Citores L., Buonamici L., Ferreras J., de Benito F., Stirpe F., Girbes T. Toxicity and cytotoxicity of nigrin b, a two-chain ribosome-inactivating protein from *Sambucus nigra*: comparison with ricin // *Arch. Toxicol.*—1997.—71.—P. 360—364.

3. Holikova Z., Hrdlickova-Cela E., Plzak J., Smetana K., Betka J., Dvorankova B., Esner M., Wasano K., Andre S., Kaltner H., Motlik J., Hercogova J., Kodet R., Gabius H. Defining the glycophenotype of squamous epithelia using plant and mammalian lectins. Differentiation-dependent expression of $\alpha 2,6$ - and $\alpha 2,3$ -linked N-acetylneuraminic acid in squamous epithelia and carcinomas, and its differential effect on binding of the endogenous lectins galectins-1 and -3 // *Acta pathol., microbiol. et immunol. scand.*—2002.—110.—P. 845—856.

4. Rossner P., Bencko V., Sram R. Сочетанное действие хрома и никеля на клеточные культуры фибробластов мышей и крыс // *Журн. гигиены, эпидемиологии, микробиологии и иммунологии.*—1981.—25, № 3.—С. 224—229.

5. *Environmental health criteria.*—Geneva: WHO, 1991.—Vol. 108.—383 p.

6. Chang-Yu Chen, Yi-Fen Wang, Yu-Hwan Lin, Shu-Fang Yen. Nickel-induced oxidative stress and effect of antioxidants in human lymphocytes // *Arch Toxicol.*—2003.—77.—P. 123—130

7. Deng C., Lee H., Xian H., Yao M. Chromosome aberrations and sister chromatide exchange of peripheral blood lymphocytes in Chinese electroplating workers. Effect of nickel and chromium // *J. Trace Elements Exp. Med.*—1988.—1, N 1.—P. 57—62.

8. *Гигиенические критерии состояния окружающей среды.*—Женева: ВОЗ, 1991.—Т. 62.—138 с.

9. Sen P., Costa M. Induction of chromosomal damage in CHO cells by soluble and particulate nickel compounds // *Cancer Res.*—1985.—45, N 5.—P. 2320—2325.

10. Newman S., Summit R., Nunez L. Incidence of nickel-induced sister-chromatide exchange // *Mutat. Res.*—1982.—101, N 1.—P. 67—75.

11. Киселева А. А., Пылев Л. Н., Лунатов Г. Я. Зависимость мутагенной активности никельсодержащей пыли от дозы и времени в микроядерном тесте // *Гигиена и санитария.*—1990.—№ 9.—С. 71—72.

12. Danadevi K., Rozati R., Saleha Banu B., Grover P. Genotoxic evaluation of welders occupationally exposed to chromium and nickel using the Comet and micronucleus assays // *Mutagenesis.*—2004.—19, N 1.—P. 35—41.

13. Morita H., Kada K., Umeda M. Mutagenicities of nickel and cobalt compounds in mammalian cell line // *Mutat. Res.*—1985.—147, N 5.—P. 265—266.

14. Amasher D., Paillet S. Induction of trifluorothymidine-resistant mutants by metal ions in L517841 TK⁺-cells // *Mutat. Res.*—1980.—78, N 3.—P. 279—288.

15. Susumu O. Induction of genetic instability and chromosomal instability by nickel sulfate in V79 Chinese hamster cells // *Mutagenesis.*—2003.—18, N 2.—P. 133—137.

16. Мацевич Л. Л., Лукаш Л. Л., Сухорада О. М. Застосування comet-тесту в еукаріотичній тест-системі для дослідження біологічної дії солей важких металів // *Укр. біохім. журн.*—2003.—75, № 6.—С. 75—80.

17. Thierse H., Moulon C., Allespach Y., Zimmermann B., Doetze A., Kuppig S., Wild D., Herberg F., Weltzien H. Metal-protein complex-mediated transport and delivery of Ni²⁺ to TCR/MHC contact sites in nickel-specific human T cell activation // *J. Immunol.*—2004.—172, N 3.—P. 1926—1934.

18. Robison S., Kosta M. The induction of DNA strand breakage

- by nickel compounds in cultured CHO cells // *Cancer Lett.*—1982.—15, N 7.—P. 35—40.
19. Сьякте Т. Г., Сьякте Н. И. Химические соединения, повреждающие ДНК.—Рига: Зинатне, 1991.—152 с.
20. Wedrychowski A., Schmidt W., Hnilica L. The *in vivo* cross-linking of proteins and DNA by heavy metals // *J. Biol. Chem.*—1986.—261, N 7.—P. 3370—3376.
21. Talkvist J., Bowlus C., Lonnerdal B. Effect of iron treatment on nickel absorption and gene expression of the divalent metal transporter (DMT1) by human intestinal Caco-2 cells // *Pharm. Toxicol.*—2003.—92, N 3.—P. 121—125.
22. Мацевич Л. Л., Коваленко О. А., Сухорада О. М., Лукаш Л. Л. Дослідження впливу білків на генетичну мінливість клітинних популяцій *in vitro* // Фактори експериментальної еволюції організмів: зб. наук. праць / Під ред. М. В. Роїка.—Київ: Аграрна наука, 2003.—С. 91—97.
23. Ostling O., Johanson K. Microelectrophoretic study of radiation-induced DNA-damages in individual mammalian cells. // *Biochem. and Biophys. Res. Commun.*—1984.—123, N 1.—P. 291—298.
24. Singh N., McCoy M., Tice R., Schneider E. A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. // *Exp. Cell Res.*—1988.—175, N 1.—P. 189—191.
25. Solovyan V., Andreev I., Kolotova T., Pogrebnoy P., Tarnavsky D. V. The ordered desintegration of nuclear DNA as a specific genome reaction accompanying apoptosis, stress response and differentiation // *Биополимеры и клетка.*—1996.—12, № 3.—С. 67—76.
26. Lukash L. L., Karpova I. S., Miroshnichenko O. S., Tikhonova T. N., Lylo V. V., Man'ko V. G., Sukhorada E. M., Golynskaya E. L. Effect of *Sambucus nigra* inflorescences lectin on spontaneous and induced by alkylating agent mutagenesis in somatic cells of mammalia // *Цитология и генетика.*—1997.—31, № 5.—P. 52—59.

УДК 575; 577
Надійшла до редакції 23.01.03