

В. Стецкая, студ., Н. Шуставецкая, студ., Т. Сергийчук, канд. биол. наук, Т. Довбинчук, мл. науч. сотр., Г. Толстанова, д-р биол. наук
Киевский национальный университет имени Тараса Шевченко, Киев, Украина

КОЛИЧЕСТВЕННЫЙ И КАЧЕСТВЕННЫЙ СОСТАВ МИКРОБИОТЫ ДИСТАЛЬНОГО ОТДЕЛА ТОЛСТОЙ КИШКИ КРЫС В РАЗНЫЕ СРОКИ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОГО 6-OHDA-ВЫЗЫВАЕМОГО ПАРКИНСОНИЗМА (ПИЛОТНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ)

В аспекте существования оси "кишечник-мозг" рассмотрено количественные изменения микробиоты дистального отдела толстой кишки экспериментальному паркинсонизму. Исследования проведены на лабораторных нелинейных крысах-самцах (140–160 г, n = 7). Паркинсонизм моделировали путем одностороннего разрушения дофаминергических нейронов компактной части черной субстанции головного мозга, вызывали путем стереотаксическим микроинъекций 12 мкг нейротоксина 6-OHDA (Sigma-Aldrich, Германия) в левый латеральный восходящий пучок. Изменения количественного состава микробиоты определяли бактериологическим путем при посеве 10-кратных разведений фекального биоптата на элективные среды (HiMedia, Индия) через 1, 1.5, 2 месяца после моделирования паркинсонизма. Исследования показали, что в составе просветной микробиоты крыс в течение 2 месяцев с начала эксперимента, достоверные изменения были выявлены только для *E.coli*. Количество лак (+) *E.coli* вырастала с 1,5 месяцев на 2 порядка (с 4.65 ± 0.80 КОЕ/г до 6.08 ± 0.70 КОЕ/г, а через 2 месяца – 4.39 ± 0.55 КОЕ/г до 6.24 ± 1.26 КОЕ/г. В то же время количество лак(-) *E.coli* снижалась на 2-3 порядка. Количество *Bifidobacterium* и *Lactobacillus* оставалась в пределах контрольных значений. Через 2 месяца после моделирования паркинсонизма наблюдалась тенденция к увеличению количества представителей рода *Clostridium*. Полученные нами данные свидетельствуют о незначительных изменениях микробиоты при развитии 6-OHDA-вызванного паркинсонизма. Данные результаты являются предварительными и требуют более подробного изучения.

Ключевые слова: микробиота, болезнь Паркинсона, нейродегенерация.

V. Stetska, stud., N. Shystavetska, stud., T. Serhiychuk, PhD, T. Dovbynychuk, JRF, G. Tolstanova, Dr. Sc.
Taras Shevchenko National University of Kyiv, Kyiv, Ukraine

QANTITATIVE AND QUALITATIVE MICROBIOTA COMPOSITION OF THE DISTAL COLON OF RATS IN DIFFERENT TERMS OF EXPERIMENTAL 6-OHDA-INDUCED PARKINSONISM (PILOT STUDY)

In the aspect of the existence of the gut brain axis are considered quantitative changes of the distal part of colon's microbiota (Mb) under conditions of experimental parkinsonism. Studies were done on laboratory non-linear male rats (140–160 g, n = 7). Parkinsonism was modeled by one-sided destruction of the dopaminergic neurons of a compact part of the substantia nigra of brain, causing by stereotaxic microinjections 12 mg neurotoxin 6-OHDA (Sigma-Aldrich, Germany) in the left lateral ascending bundle. Changes in the quantitative Mb composition were determined bacteriologically by sowing 10-fold dilutions of fecal biopsy on differential diagnostic media (HiMedia, India) in 1, 1.5, 2 months after induced parkinsonism. Research has been shown that within the fecal Mb of rats, within 2 months from the beginning of the experiment, significant changes were detected only for *E.coli*. The amount of lac(+) *E.coli* increased from 1.5 months to 2 folds (from 4.65 ± 0.80 CFU/g to 6.08 ± 0.70 CFU/g (1.5 months), after 2 months – from 4.39 ± 0.55 CFU/g to 6.24 ± 1.26 CFU/g. At the same time, the amount of *E.coli* lac(-) decreased by 2-3 folds. The number of the genus *Bifidobacterium* and *Lactobacillus* remained within the control values. After 2 months after induced parkinsonism, there was a tendency to increase the number of *Clostridium* species. These results suggest minor microbiota changes of 6-OHDA-induced parkinsonism in rats. These results are preliminary and require more detailed study.

Key words: microbiota, Parkinson's disease, neurodegeneration.

УДК 577.217.5

Л. Коломієць, в. о. наук. співроб.
Інститут молекулярної біології і генетики НАН України, Київ, Україна,
В. Засць, канд. біол. наук, О. Цуварєв, мол. наук. співроб.
Київський національний університет імені Тараса Шевченка, Київ, Україна,
О. Корнелюк, чл.-кор. НАН України, д-р біол. наук, проф.
Інститут молекулярної біології і генетики НАН України, Київ, Україна

ДОСЛІДЖЕННЯ ВПЛИВУ НАНОКОМПОЗИТНОГО КОМПЛЕКСУ ЦИТОКІНУ ЕМАР II З ДЕКТРАНОМ 70 НА ОРГАНІЗМ МИШЕЙ ЛІНІЇ BALB/C

Цитокін ЕМАР II – ендотеліальний та моноцитарноактивуючий поліпептид II, попередником якого є компонент високомолекулярного комплексу аміноацил-тРНК-синтетази вищих еукаріот білок p43, здатен модулювати властивості ендотеліальних клітин, моноцитів та лейкоцитів. У малих концентраціях цитокін стимулює, а у великих – пригнічує міграцію ендотеліальних клітин, стимулює їх апоптоз, впливає на активність моноцитів, нейтрофілів, макрофагів, сприяючи таким чином запальним та некротичним процесам у злоякісних пухлинах. Одним із перспективних напрямів таргетної терапії онкозахворювань є використання антиангіогенних, прокоагулятивних та проапоптичних лікарських засобів, що стало основою для вибору об'єктом досліджень протипухлинного цитокіну ЕМАР II.

В Інституті молекулярної біології і генетики НАН України розроблено біотехнологію експресії рекомбінантного ЕМАР II у клітинах *E.coli* BL21(DE3) та виділення високоочищених препаратів цитокіну в препаративних кількостях. Для підвищення стабільності та зниження агрегації рекомбінантного ЕМАР II розроблено науково-методичні основи створення та отримано нанокмпозитний комплекс цитокіну ЕМАР II з біосумісними полімерами циклодекстринами та декстраном 70. У цій експериментальній роботі досліджено вплив нанокмпозитного комплексу ЕМАР II з декстраном-70 на організм тварин із метою визначення безпечності його застосування. Як об'єкт досліджень було використано мишей лінії BALB/C. Експериментальні дослідження показали, що в разі гострого та хронічного введення препарату тваринам в дозах 300–10 000 мкг/кг не спостерігається загальнотоксичної дії нанокмпозитного комплексу на організм мишей. Отримані дані відкривають перспективу подальшого дослідження протипухлинних властивостей нанокмпозитного комплексу ЕМАР II з декстраном-70 з метою можливого подальшого впровадження в фармакологічну практику.

Ключові слова: нанокмпозитний комплекс ЕМАР II, гостра токсичність, хронічна токсичність.

Створення нових біомедичних препаратів на основі рекомбінантних білків є одним з пріоритетних напрямів сучасної біотехнології [1]. На сьогодні для отримання функціонально активних рекомбінантних білків розроблено декілька гетерологічних систем, які містять клітинні лінії ссавців, клітини дріжджів і бактерій, а також бакуловірусні системи на основі клітинних ліній комах [2,

3]. Найбільш вживаною серед них є бактеріальна система на основі *E.coli* завдяки наявності великої кількості ефективних експресуючих векторів, можливості швидкого та дешевого отримання великої кількості рекомбінантних білків в нативному стані, простоті їх виділення та очищення, що є необхідною умовою впровадження в біотехнологічне виробництво [4].

Розроблений в Інституті молекулярної біології і генетики НАН України протипухлинний нанокмпозитний комплекс ЕМАР ІІ (endothelial monocyte-activating polypeptide ІІ) з декстраном 70, у якому активним компонентом виступає білок із протипухлинними властивостями ЕМАР ІІ, є перспективним біотехнологічним продуктом для досліджень [5].

Білок ЕМАР ІІ є мультифункціональним цитокінподібним білком, який утворюється у злоякісних пухлинах ссавців завдяки альтернативному сплайсингу та посттрансляційному процесингу його попередника – білка р43 [6, 7]. Виявлено здатність ЕМАР ІІ у малих концентраціях стимулювати, а у великих – пригнічувати міграцію ендотеліальних клітин, стимулювати їх апоптоз та аутофагію [8–10], впливати на активність моноцитів, нейтрофілів і макрофагів, сприяючи запальним процесам в пухлинах [11]. Відоме застосування цитокіну ЕМАР ІІ як засобу, який проявляє протипухлинну дію на ріст карциноми передміхурової залози [12], аденокарциноми підшлункової залози [13] та гліом [10, 13]. Реконбінантний ЕМАР ІІ виявляє ті самі властивості, що й нативний білок. Для нього характерні протипухлинна активність, гальмування проліферації клітин, стимулювання апоптозу, участь в ангіогенезі та ембріогенезі [12–14].

Нанокмпозитний комплекс ЕМАР ІІ з декстраном 70 створено з метою стабілізації реконбінантного білка в процесі ліофілізації, зниженню його агрегації, та пролонгації терапевтичної дії препарату. На трансформованих лінійних клітин L929 (фібробласти зі сполучної тканини миші С3Н/Ап, сублінія "а"), отриманих з клітинного банку Інституту експериментальної онкології та радіобіології ім. Р. Є. Кавецького НАН України, та ліній клітин РСТ (тестикули поросяти), отриманих з колекції Інституту ветеринарної медицини УААН, було показано, що в разі концентрації нанокмпозитного комплексу ЕМАР ІІ 50 мкг/мл спостерігається зниження кількості клітин в моношарі порівняно з контролем [15]. У зв'язку з цим метою нашої роботи було дослідження впливу нанокмпозитного комплексу ЕМАР ІІ на організм тварин.

Матеріали і методи. Експресія, виділення та очищення реконбінантного білка ЕМАР ІІ з клітин *E.coli*. У роботі використано штам-продуцент реконбінантних білків, отриманий на основі реципієнта *E.coli* BL21(DE3)pLysE. Клітини були трансформовані за загальноприйнятою методикою плазмідною конструкцією рЕТ30а-ЕМАР ІІ, що містила ген, який кодує синтез цільового білка ЕМАР ІІ під контролем промотора фага Т7. Селективним маркером плазміди рЕТ30а є ген *kan*, який забезпечує стійкість трансформованих клітин до антибіотику канаміцина.

Штам-продуцент *E.coli* BL21(DE3)pLysE вирощували на середовищі Luria-Bertani (LB) з додаванням антибіотику канаміцина до кінцевої концентрації 30 мкг/мл. Культуру *E.coli* інкубували при температурі 37 °С та інтенсивному струшуванні (250 об/хв.) до досягнення нею оптичної густини 0,5–0,7 опт. од. Оптичну густину (ОГ₆₀₀) визначали спектрофотометрично (спектрофотометр BioMate-5, Велика Британія) за довжини хвилі 600 нм.

Для індукції синтезу реконбінантного білка до культурального середовища додавали індуктор ІПТГ (ізопропіл-β-тіогалактопіранозид, Sigma, США) до кінцевої концентрації 1,25 мМ та інкубували культуру при 37 °С протягом 4 годин після індукції експресії.

Реконбінантний білок отримували із супернатанту клітин *E.coli* після їх лізису ультразвуком методом метал-хелатуючої хроматографії на колонці з Ni-NTA агарозою (Qiagen, Germany) [16]. Аналіз бактеріальних білків виконували за допомогою SDS-гель-

електрофорезу за методом Леммлі в денатуруючих умовах у 12 % розділяючому гелі [17], використовуючи суміш маркерних білків виробництва Thermo Scientific (Литва). Гелі фарбували Coomassie blue R-250.

Нанокмпозитний комплекс ЕМАР ІІ отримували шляхом додавання до реконбінантного білка ліганду полісахариду декстран-70 у концентрації 1,5 % [2]. Для дослідження використовували нанокмпозитний комплекс ЕМАР ІІ у вигляді ліофілізованого порошку білого кольору в ампулі з концентрацією 0,1 мг. Нанокмпозитний комплекс добре розчиняється у дистильованій воді та фізіологічному розчині протягом декількох секунд з утворенням прозорого розчину.

Токсикологічні випробовування. Токсикологічні випробовування нанокмпозитного комплексу здійснювали на лабораторних самцях мишей лінії Balb/c, вирощених у віварії Інституту молекулярної біології і генетики НАН України згідно зі стандартними вимогами щодо доклінічних досліджень лікарських засобів. Тварини утримувались в умовах віварію в стандартних клітках на підстилці з тирси дерев згідно з правилами групового тримання тварин. Харчовий раціон містив зерно, овочі, брикети з вітамінами та мінеральними складовими. Доступ до води був вільним, світловий режим природний. Для досліду відбирали здорових тварин з гладким шерстним покривом, нормальною активністю. Із загальної кількості відібраних тварин формували рівноцінні групи й розміщували по окремих клітках. Для приготування робочих розчинів використовували стерильну воду для ін'єкцій. Препарат тваринам вводили внутрішньом'язово в обсязі 0,1 мл/10 г маси тіла. Дози розраховували в мкг/кг маси тіла тварини. Як плацебо використовували воду для ін'єкцій. Експериментальні дослідження виконували на 24 мишах вагою 20–25 г. Нанокмпозитний комплекс вводили одноразово мишам в дозах 300 мкг/кг, 1000 мкг/кг та 10000 мкг/кг, які перевищують очікувану терапевтичну дозу в 30–1000 разів. В експерименті оцінювали такі показники: 14-добову летальність (реєструвалася щоденно), загальний стан, поведінку, збудливість та рухову активність тварин, динаміку зростання маси тіла, порушення пози та координації рухів, макроскопічні зміни внутрішніх органів.

Для оцінки можливості хронічного впливу нанокмпозитного комплексу на організм тварин використовували самців мишей лінії BALB, віком 2–3 місяці. Нанокмпозитний препарат ЕМАР ІІ підшкірно вводили мишам в дозах 300, 1000 мкг/кг маси тіла, що перевищує терапевтичну дозу в 30 та 100 разів відповідно протягом 30 діб. Загальну дію нанокмпозитного комплексу ЕМАР ІІ оцінювали за динамікою маси тіла тварин під час зважування 2 рази на тиждень. Вегетативний статус оцінювали по стану слизових, шерстяного покриву, наявності саливації, діареї, охайності тварин. Контрольна група мишей отримувала воду для ін'єкцій.

Результати та їх обговорення. Експресія, виділення та очистка реконбінантного білка АІМР1/р43 з клітин *E.coli*. Білок ЕМАР ІІ було експресовано в клітинах *E.coli* BL21(DE3)pLysE, як описано вище. Після здійснення бактеріальної експресії виконували афінне очищення реконбінантного білка ЕМАР ІІ металхелатуючою хроматографією на Ni-NTA-агарозі. У результаті очищення отримано препарат білка ЕМАР ІІ високого ступеня чистоти (близько 95 %, рис. 1).

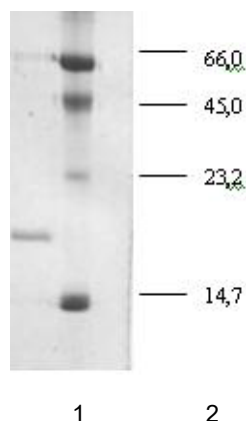


Рис. 1. Електрофоретичний контроль чистоти отриманого препарату ЕМАРІІ.

1 – препарат ЕМАР ІІ після хроматографічного очищення;
2 – білкові маркери (Thermo Scientific)

Дослідження токсичного впливу нанокм-позитного комплексу ЕМАР ІІ на тварин. Раніше під час дослідження *in vivo* впливу рекомбінантного ЕМАР ІІ на розвиток ксенографтів аденокарциноми простати людини в організмі дорослих мишей лінії СВА було показано, що препарат в дозах 10, 100 та 200 мкг/кг ваги тварин у разі систематичного введення протягом 3 днів інгібує дозозалежним чином розвиток пухлини, але не виявляє токсичного ефекту на організм контрольних тварин [12]. Аналогічні дані були отримані під час вивчення дії ЕМАР ІІ на розвиток клітин С₆ гліоми криси в організмі мишей у разі щоденного введення препарату цитокіну протягом 12 днів у дозах 8 та 80 мкг/кг [14]. Було показано, що період напіввиведення ЕМАР ІІ з плазми піддослідних мишей у разі внутрішньовенного введення дорівнює 47 хвилин [9].

Оскільки ЕМАР ІІ, як і більшість цитокінів, є нестабільним білком, то для його стабілізації ми використали декстран 70, який, як відомо, під час взаємодії з білками

призводить до їх стабілізації та можливого підвищення біологічної активності.

Вивчення впливу комплексу ЕМАР ІІ з декстраном 70 на клітини раку простати людини лінії LNCaP вперше виявило цитотоксичну дію препарату на ракові клітини *in vitro* в дозах 1 та 10 мкг на мл середовища. Було показано, що інгібуючий ефект комплексу пов'язаний з розвитком апоптозу ракових клітин в культурі [18]. Цитотоксичний вплив комплексу ЕМАР ІІ з декстраном 70 був показаний також під час дослідження його дії на культури трансформованих клітинних ліній L929 фібробластів миші та PST тестикул поросяти [15].

Водночас вплив комплексу ЕМАР ІІ з декстраном 70 на організм тварин ще невідомий. Тому було вирішено протестувати його дію на тварин на модельному об'єкті та визначити межі можливої токсичності препарату. Як модельний об'єкт у роботі було взято мишей лінії Balb/c. Для вивчення дії цитокінового комплексу на організм мишей ми виходили з активно діючої на ракові клітини, згідно з літературними даними, дози 10 мкг/кг, яку перевищували до 1000 разів у разових дозах і до 100 раз перевищували для визначення хронічного впливу комплексу на тварин.

Експериментальні дослідження токсичного впливу нанокм-позитного препарату ЕМАР ІІ на мишах показали, що в разі введення препарату в разових дозах 300–10 000 мкг/кг не спостерігається загальнотоксичної дії препарату, і він не спричинює загибель тварин. Одразу після введення препарату спостерігалася спонтанна рухлива збудливість. При цьому миші зберігали координацію рухів. Не було порушень дефекації, сечовипускання та інших ознак нейротоксичності. Стан слизових, шерстяний покрив та охайність залишалися без змін. Протягом наступних 14 днів спостереження за тваринами не виявлено змін в поведінці та загальному стані тварин. Спостерігалася і позитивна динаміка маси тіла. Зважування робили на 1, 7 та 14-ту добу після введення препарату. Результати зважування трьох піддослідних груп мишей, кожна з яких складалася з 6 особин, наведені в табл. 1

Таблиця 1. Динаміка маси тіла тварин у різних групах після введення нанокм-позитного комплексу ЕМАР ІІ

	група I (300 мкг/кг)	група II (1000 мкг/кг)	група III (10 000 мкг/кг)	контроль
1 доба	23,57 ± 2,3	24,17 ± 1,4	24,23 ± 0,8	24,07 ± 1,2
7 доба	24,67 ± 2,5	25,58 ± 1,2	25,82 ± 1,5	25,73 ± 1
14 доба	27,62 ± 1,2	27,2 ± 0,9	28,33 ± 1,1	27,77 ± 0,6

Аутопсія після завершення дослідження впливу нанокм-позитного препарату на організм тварин включно до 10 000 мкг/кг ваги не виявила патологоанатомічних ознак токсичності препарату в органах мишей. Не спостерігалася також суттєвого впливу препарату і на подальшу життєдіяльність тварин.

Під час дослідження хронічної токсичності нанокм-позитного комплексу ЕМАР ІІ з декстраном 70 на ми-

шей було проаналізовано масові коефіцієнти внутрішніх органів тварин. Макроскопічне дослідження внутрішніх органів мишей показало, що препарат не викликає у піддослідних тварин патологічних декструктивних змін в їх органах. Різниця у вазі контрольних та піддослідних мишей не було виявлено. Дані експерименту наведено в табл. 2.

Таблиця 2. Дослідження ваги внутрішніх органів тварин після введення нанокм-позитного комплексу ЕМАР ІІ

	група I (300 мкг/кг)		група II (1000 мкг/кг)		контроль	
	1	2	1	2	1	2
серце	0,25	0,27	0,23	0,26	0,21	0,25
печінка	2,14	1,21	1,52	1,89	1,7	1,7
нирки	0,37-0,37	0,32-0,32	0,36-0,33	0,33-0,35	0,36-0,38	0,34-0,34
селезінка	0,14	0,14	0,14	0,12	0,17	0,17
легені	0,44	0,32	0,45	0,35	0,27	0,27

Таким чином, здійснені нами дослідження з визначення впливу комплексу ЕМАР II з декстраном на лабораторних мишах показали, що препарат не має вираженої токсичної дії на організм тварин. Ці дослідження відкривають можливості подальших біомедичних та структурно-функціональних досліджень нанокompatного комплексу ЕМАР II для застосування в перспективі в біомедицині.

Висновки. Нанокompatний комплекс ЕМАР II не виявляє вираженої токсичної дії на організм мишей лінії Balb/c в одноразовому введенні в досліджуваних дозах 300, 1000 та 10 000 мкг/кг, які перевищують активну дію дозу препарату 10 мкг/кг в 30, 100 та 1000 разів, та хронічному введенні протягом 30 днів в дозах 300 та 1000 мкг/кг. Препарат не виявляє суттєвого впливу на масовий приріст, стан та поведінку тварин.

Список використаних джерел:

1. Глик Б. Молекулярная биотехнология. Принципы и применение / Б. Глик, Дж. Пастернак. – М.: Из-во Мир. 2002. – 589 с.
2. Adrio J. L. Recombinant organisms for production of industrial products / J. L. Adrio, A. L. Demain // Bioeng. Bugs. – 2010. – Vol. 1, № 2. – P. 116–131.
3. Sahdev S. Production of active eucariotic proteins through bacterial expression systems: a review of the existing biotechnology strategies / S. Sahdev, S. K. Khattar, K. S. Saini // Mol. Cell. Biochem. – 2008. – Vol. 307, № 2. – P. 249–264.
4. Rosano G. L. Recombinant protein expression in Escherichia coli: advances and challenges / G. L. Rosano, E. A. Cessarelli // Frontiers in Microbiol. – 2014. – Vol. 5. – P. 1–17.
5. Application for Invention "Nanocomposite anti-cancer agent" / A. I. Kornelyuk, L. A. Babenko, A. V. Kozlov et al. UA. Patent 17851 / ZU / 11, August 29, 2011.
6. Endothelial monocyte activating polypeptide II. A novel tumor-derived polypeptide that activates host-response mechanisms / J. Kao, J. Ryan, G. Brett et al. // J. Biol. Chem. – 1992. – Vol. 267. – P. 20239–20247.
7. The EMAPII cytokine is released from the mammalian multisynthetase complex after cleavage of its p43/proEMAPII component / V. Shalak, M. Kaminska, R. Mitnacht-Kraus et al. // J. Biol. Chem. – 2001. – Vol. 276. – P. 23769–76.
8. Endothelial monocyte-activating polypeptide II, a tumor-derived monocyte-activating polypeptide II, that plays an important role in inflammation, apoptosis, and angiogenesis / A. C. Berger, G. Tang, H. R. Alexander, S. K. Libutti // J. Immunother. – 2000. – Vol. 23. – P. 519–527.
9. Endothelial-monocyte activating polypeptide II, a novel antitumour cytokine that suppresses primary and metastatic tumour growth and induces apoptosis in growing endothelial cells / M. A. Schwarz, J. Kandel, J. Brett et al. // J. Exp. Med. – 1999. – Vol. 190. – P. 341–54.
10. Lou-dose Endothelial monocyte activating polypeptide II induced autophagy by down-regulation miR-20a in U-87 and U-251 glioma cells / J. Chen, L. Liu, X. Liu et al. // Frontiers in Cellular Neuroscience. – 2016. – Vol. 10.
11. Van Horssen R. Endothelial monocyte-activating polypeptide II and its functions in (patho)physiological processes / R. van Horssen, A. M. Eggermont, T. L. ten Hagen // Cytokine Growth Factor Rev. – 2006. – Vol. 17. – P. 339–348.
12. Antitumor effect of endothelial monocyte-activating polypeptide-II on human prostate adenocarcinoma in mouse xenograft model / A. G. Reznikov, L. V. Chaykovskaya, L. I. Polyakova, A. I. Kornelyuk // Exp. Oncol. – 2007. – Vol. 29. – P. 267–271.
13. EMAP II-based antiangiogenic-antiendothelial in vivo combination therapy of pancreatic cancer / R. E. Schwarz, N. Awasthi, S. Konduri et al. // Ann. Surg. Oncol. – 2010. – Vol. 17, № 5. – P. 1442–1452.
14. Schwarz R. E. In vivo therapy of local tumor progression by targeting vascular endothelium with EMAP II / R. E. Schwarz, M. A. Schwarz // J. Surg. Res. – 2004. – Vol. 120. – P. 64–72.
15. Nanocomposite complex EMAP II influence on tumor necrosis factor and interferon in vitro / L. A. Kolomiets-Babenko, O. S. Bohorad-Kobelska, N. L. Kovalchuk et al. // Biotechnologia Acta. – 2016. – Vol. 9, # 5. – P. 18–23.
16. Bacterial expression optimization of EMAP II antitumor cytokine in E.coli BL21(DE3)pLys / L. A. Babenko, O. Y. Skorobogatov, O. L. Dubrovsky, O. I. Kornelyuk // Microbiology and Biotechnology – 2010. – Vol. 3. – P. 21–31.
17. Laemmli U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4 // Nature / U. K. Laemmli. – 1970. – Vol. 227, № 5259. – P. 680–685.
18. Goloborodko T. A. Polypeptide EMAP II inhibits growth and stimulates apoptosis of the LnCaP prostate cancer cell line / T. A. Goloborodko, L. I. Polyakova, A. V. Sotkis // J. of the Nation Academy of Medical Sciences of Ukraine – 2010. – Vol. 16, № 4. – P. 681–690.

References:

1. Glick B, Pasternak J. Molecular biotechnology. Principles and applications. Moscow: Mir. 2002; 589.
2. Adrio JL, Demain AL. Recombinant organisms for production of industrial products. Bioeng. Bugs. 2010;1(2):116-131.
3. Sahdev S, Khattar SK, Saini KS. Production of active eucariotic proteins through bacterial expression systems: a review of the existing biotechnology strategies. Mol Cell Biochem. 2008; 307 (2): 249-264.
4. Rosano GL, Cessarelli EA. Recombinant protein expression in Escherichia coli: advances and challenges. Frontiers in Microbiol. 2014; 5 (): 1-17.
5. Kornelyuk AI, Babenko LA, Kozlov AV, Reznikov AG, Chaikovska LV, Polyakova LI. Application for Invention "Nanocomposite anti-cancer agent". UA. Patent 17851 / ZU / 11, August 29, 2011.
6. Kao J, Ryan J, Brett G, et al. Endothelial monocyte activating polypeptide II. A novel tumor-derived polypeptide that activates host-response mechanisms. J Biol Chem. 1992; 267 (): 20239-20247.
7. Shalak V, Kaminska M, Mitnacht-Kraus R, Vandanebee P, Clauss M, Mirande M. The EMAPII cytokine is released from the mammalian multisynthetase complex after cleavage of its p43/proEMAPII component. J Biol Chem. 2001; 276 (): 23769–76.
8. Berger AC, Tang G, Alexander HR, Libutti SK. Endothelial monocyte-activating polypeptide II, a tumor-derived monocyte-activating polypeptide II, that plays an important role in inflammation, apoptosis, and angiogenesis. J Immunother 2000; 23 (): 519–27.
9. Schwarz MA, Kandel J, Brett J et al. Endothelial-monocyte activating polypeptide II, a novel antitumour cytokine that suppresses primary and metastatic tumour growth and induces apoptosis in growing endothelial cells. J Exp Med. 1999; 190 (): 341-54.
10. Chen J, Liu L, Liu X, Qui C, Meng F, Ma J, Lin Y, Xue Y. Lou-dose Endothelial monocyte activating polypeptide II induced autophagy by down-regulation miR-20a in U-87 and U-251 glioma cells. Frontiers in Cellular Neuroscience. 2016; 10 ():
11. van Horssen R, Eggermont AM, ten Hagen TL. Endothelial monocyte-activating polypeptide II and its functions in (patho)physiological processes. Cytokine Growth Factor Rev. 2006; 17 (): 339-48.
12. Reznikov AG, Chaykovskaya LV, Polyakova LI, Kornelyuk AI. Antitumor effect of endothelial monocyte-activating polypeptide-II on human prostate adenocarcinoma in mouse xenograft model. Exp Oncol. 2007; 29 (): 267–71.
13. Schwarz RE1, Awasthi N, Konduri S, Cafasso D, Schwarz MA. EMAP II-based antiangiogenic-antiendothelial in vivo combination therapy of pancreatic cancer. Ann Surg Oncol. 2010; 17(5):1442-52.
14. Schwarz RE, Schwarz MA. In vivo therapy of local tumor progression by targeting vascular endothelium with EMAP II. J Surg Res 2004; J Surg Res 2004; 120 (): 64–72.
15. Kolomiets-Babenko LA, Bohorad-Kobelska OS, Kovalchuk NL, Spivak MJ, Kornelyuk AI. Nanocomposite complex EMAP II influence on tumor necrosis factor and interferon in vitro. Biotechnologia Acta. 2016; 9 (5):
16. Babenko LA, Skorobogatov OY, Dubrovsky OL, Kornelyuk OI. Bacterial expression optimization of EMAP II antitumor cytokine in E.coli BL21(DE3)pLys. Microbiology and Biotechnology. 2010; 3 (): 21-31.
17. Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature. 1970; 227 (5259): 680-685
18. T.A. Goloborodko, L.I. Polyakova, A.V. Sotkis, A.I. Korneliuk, L.A. Babenko, Ya.M. Shuba, A.G. Reznikov. Polypeptide EMAP II inhibits growth and stimulates apoptosis of the LnCaP prostate cancer cell line J. of the Nation Academy of Medical Sciences of Ukraine. 2010; 16(4): 681-690.

Надійшла до редакції 03.09.2018

Отримано виправлений варіант 04.10.2018

Підписано до друку 03.10.2018

Received in the editorial 03.10.2018

Received a revised version on 04.10.2018

Signed in the press on 04.10.2018

Л. Коломиец, и. о. науч. сотр.

Институт молекулярной биологии и генетики НАН Украины, Киев, Украина,

В. Заец, канд. биол. наук, А. Цуварев, мл. науч. сотр.

Киевский национальный университет имени Тараса Шевченка, Киев, Украина,

О. Корнелиук, чл.-кор. НАН Украины, д-р биол. наук, проф.

Институт молекулярной биологии и генетики НАН Украины, Киев, Украина

ИССЛЕДОВАНИЕ ВЛИЯНИЯ НАНОКОМПОЗИТНОГО КОМПЛЕКСА ЦИТОКИНА ЕМАР II С ДЕКТРАНОМ 70 НА ОРГАНИЗМ МЫШЕЙ ЛИНИИ BALB/C

Цитокин ЕМАР II – эндотелиальный и моноцитарноактивирующий полипептид II, предшественником которого является компонент высокомолекулярного комплекса аминокислот-мРНК-синтетаза высших эукариот белок p43, способен модулировать свойства эндотелиальных клеток, моноцитов и лейкоцитов. В малых концентрациях цитокин стимулирует, а в больших – подавляет миграцию эн-

дотелиальных клеток, стимулирует их апоптоз, влияет на активность моноцитов, нейтрофилов, макрофагов, способствуя таким образом воспалительным и некротическим процессам в злокачественных опухолях. Одним из перспективных направлений таргетной терапии онкозаболеваний является использование антиангиогенных, прокоагулятивных и проапоптотических лекарственных средств, что послужило основой для выбора в качестве объекта исследований противоопухолевого цитокина ЕМАР II. В Институте молекулярной биологии и генетики НАН Украины разработана биотехнология бактериальной экспрессии рекомбинантного ЕМАР II в клетках *E.coli* BL21 (DE3) и выделения высокоочищенных препаратов цитокина в препаративных количествах. Для повышения стабильности и снижения агрегации рекомбинантного ЕМАР II разработаны научно-методические основы создания и получены наноконъюгаты комплексы цитокина ЕМАР II с биосовместимыми полимерами циклодекстринами и декстраном 70. В данной экспериментальной работе исследовано влияние наноконъюгата ЕМАР II с декстраном-70 на организм животных с целью установления безопасности его применения. В качестве объекта исследований были использованы мыши линии BALB/C. Экспериментальные исследования показали, что при остром и хроническом введении препарата животным в дозах 300–10 000 мкг/кг не наблюдается общетоксического действия наноконъюгата ЕМАР II на организм мышей. Полученные данные открывают перспективу дальнейшего исследования противоопухолевых свойств наноконъюгата ЕМАР II с декстраном-70 с целью возможного дальнейшего внедрения в фармакологическую практику.

Ключевые слова: наноконъюгат ЕМАР II, острая токсичность, хроническая токсичность.

L. Kolomiets, research assist.
Institute of Molecular Biology and Genetics of NASU, Kyiv, Ukraine,
V. Zayets, PhD, O. Tsuvariev research assist.
Taras Shevchenko National University of Kyiv, Kyiv, Ukraine,
A. Kornelyuk, Dr. Sc., Corresponding Member of NASU
Taras Shevchenko National University of Kyiv, Kyiv, Ukraine

INVESTIGATION OF INFLUENCE OF EMAP II CITOKIN NANOCOMPOSITE COMPLEX WITH DEXTRAN 70 THE BALB/C LINES MUSCLE ORGANISM

The cytokine EMAP II is endothelial and monocytic-activating polypeptide II, the precursor of which is the component of the high-molecular complex aminoacyl-tRNA synthetase of the higher eukaryotes of the protein p43, is capable of modulating the properties of endothelial cells, monocytes and leukocytes. In low concentrations the cytokine stimulates and in high concentrations it suppresses the migration of endothelial cells, stimulates their apoptosis, affects the activity of monocytes, neutrophils, macrophages, thus contributing to inflammatory and necrotic processes in malignant tumors. One of the promising directions of targeted therapy of oncological diseases is the use of antiangiogenic, procoagulative and proapoptotic drugs, which became the basis for the selection of an antitumor cytokine EMAP II as an object of research. In the Institute of Molecular Biology and Genetics of the National Academy of Sciences of Ukraine, the biotechnology of bacterial expression of recombinant EMAP II in *E.coli* BL21 (DE3) cells and isolation of highly purified cytokine preparations in preparative amounts have been developed. In order to increase the stability and reduce the aggregation of recombinant EMAP II, scientific and methodological foundations were created and nanocomposite complexes of the cytokine EMAP II with biocompatible polymers with cyclodextrin and dextran 70 were obtained. In this experimental work, the effects of the nanocomposite complex EMAP II and dextran-70 on the animal organism were investigated for the purpose of establishing safety of its use. BALB / C mice were used as an object of research. Experimental studies have shown that acute and chronic administration of the drug to animals at doses of 300 – 10 000 µg / kg does not show the general toxic effects of the nanocomposite complex on the organism of mice. The obtained data open the prospect of further investigation of antitumor properties of the nanocomposite complex EMAP II with dextran-70 with the aim of possible further introduction into pharmacological practice.

Key words: nanocomposite complex EMAP II, acute toxicity, chronic toxicity.

УДК 577.13: 581.198: 54.056

A. Revutska, PhD stud., V. Belava, PhD, A. Golubenko, PhD, N. Taran, DSc, Prof.
ESC "Institute of Biology and Medicine",
Taras Shevchenko National University of Kyiv, Kyiv, Ukraine

DETERMINATION OF XANTHONES IN PLANTS AND THE NUTRIENT MEDIUM UNDER *IN VITRO* CULTIVATION CONDITIONS

In recent years, xanthenes have received considerable attention from scientists due to their biological activity: anti-carcinogenic, antiviral, antibacterial, antioxidant, anti-inflammatory and other properties. Therefore they are useful for prevention and treatment of different diseases: cancer, Alzheimer's and Parkinson's disease, cardiovascular disorders, diabetes, etc. Extracts of different species of plants containing xanthenes are components of chemotherapeutic and other medical drugs. In order to find the most sensitive and environmentally safe method of quantitative determination of xanthenes in the plant material and the nutrient medium, known methods were tested and selected for the prototype Vyisochina G. I. et al., 2011 method, which uses ethanol as an extractor. As the plant material we used plants of different species that were grown under *in vitro* cultivation conditions on the agarized nutrient medium. This agarized nutrient medium was also used for the xanthone content analysis. Based on the performed research, modifications of the method for determining the content of xanthenes were adapted to the *in vitro* conditions, which detail the specificity of extraction and quantitative calculation of the xanthone content in plant extracts. Our own method of determination of these compounds in the agarized nutrient medium was developed as well. The method, that we proposed, will significantly speed up the process of xanthone detecting and will also increase their yield in biotechnological processes for obtaining the pharmacologically valuable secondary metabolites of phenolic nature.

Key words: xanthenes, chromatography, spectrophotometry, *in vitro*, plants, nutrient medium.

Introduction. Xanthenes – heterocyclic polyphenolic compounds, which are particularly valuable secondary metabolites. Vascular plants produce 79 % of all known xanthenes of natural origin, non-lichenized fungi – 16 %, lichens – the remaining 5 % [4, 9]. In recent years, these polyphenolic compounds have received considerable attention from scientists due to their biological activity, namely: anti-carcinogenic, antiviral, antibacterial, antioxidant, anti-inflammatory and other properties. Therefore they are used to prevent and treat cancer, Alzheimer's and Parkinson's disease, cardiovascular disorders, diabetes, etc. [1, 10]. Extracts of different species of plants containing xanthenes

are components of chemotherapeutic and other medical drugs. These compounds perform a protective function in plants: provide resistance to stress and pathogens, participate in the allelopathic interactions, as well as in the processes of general development of the plant organism [3].

The massive collection of plants as a medicinal material, which is the source of xanthenes, destructively affects the species composition of natural phytocoenoses. Thus, the species of plants as sources of xanthenes from the families *Gentianaceae*, *Hypericaceae* and others already have a rare and endangered status [2, 6, 7]. Consequently, it is important to search for alternative sources of xanthenes, which