

Обзорная статья

УДК 577.112:577.114:594

DOI: 10.31857/S0869769825010079

EDN: HNLICW

Лектины морских беспозвоночных: выделение, свойства и биологическая активность

И. В. Чикаловец, Т. О. Мизгина, А. П. Фильштейн,
А. С. Кузьмич, О. В. Черников✉

Ирина Владимировна Чикаловец

кандидат химических наук, старший научный сотрудник

Тихоокеанский институт биоорганической химии им. Г.Б. Елякова ДВО РАН,
Владивосток, Россия

ivchik6@mail.ru

<https://orcid.org/0000-0001-5102-9311>

Татьяна Олеговна Мизгина

кандидат химических наук, младший научный сотрудник

Тихоокеанский институт биоорганической химии им. Г.Б. Елякова ДВО РАН,
Владивосток, Россия

tanya.tasha@mail.ru

<https://orcid.org/0000-0002-9587-897X>

Алина Петровна Фильштейн

кандидат химических наук, младший научный сотрудник

Тихоокеанский институт биоорганической химии им. Г.Б. Елякова ДВО РАН,
Владивосток, Россия

alishichka@mail.ru

<https://orcid.org/0009-0000-6293-6582>

Александра Сергеевна Кузьмич

научный сотрудник

Тихоокеанский институт биоорганической химии им. Г.Б. Елякова ДВО РАН,
Владивосток, Россия

assavina@mail.ru

<https://orcid.org/0000-0001-5358-5880>

Олег Викторович Черников

кандидат биологических наук, заместитель директора

Тихоокеанский институт биоорганической химии им. Г.Б. Елякова ДВО РАН,
Владивосток, Россия

chernikov@piboc.dvo.ru

<https://orcid.org/0000-0002-3076-3637>

Аннотация. Интерес к морским организмам обусловлен большим содержанием в них биологически активных веществ, которые являются объектами фундаментальных и прикладных медико-биологических исследований и эффективны для разработки терапевтических и профилактических средств против широкого спектра заболеваний. В лаборатории химии неинфекционного иммунитета ТИБОХ ДВО РАН проводят исследования по поиску, выделению, установлению структуры, изучению физико-химических свойств и биологической активности лектинов из морских беспозвоночных. Из двустворчатых моллюсков были выделены лектины разной углеводной специфичности, физиологическая роль которых заключается в участии во врожденном иммунитете моллюсков. Эти белки обладают разной биологической активностью, в том числе антибактериальной и антипролиферативной.

Ключевые слова: лектины, морские беспозвоночные, биологическая активность

Для цитирования: Чикаловец И.В., Мизгина Т.О., Фильштейн А.П., Кузьмич А.С., Черников О.В. Лектины морских беспозвоночных: выделение, свойства и биологическая активность // Вестн. ДВО РАН. 2025. № 1. С. 104–119. <http://dx.doi.org/10.31857/S0869769825010079>

Финансирование. Исследование выполнено в рамках государственного задания (рег. № 124032100017-5).

Review article

Marine invertebrate lectins: isolation, properties and biological activity

I. V. Chikalovets, T. O. Mizgina, A. P. Filshtein,
A. S. Kuzmich, O. V. Chernikov

Irina V. Chikalovets

Candidate of Sciences in Chemistry, Senior Researcher

G.B. Elyakov Pacific Institute of Bioorganic Chemistry, FEB RAS, Vladivostok, Russia
ivchik6@mail.ru

<https://orcid.org/0000-0001-5102-9311>

Tatyana O. Mizgina

Candidate of Sciences in Chemistry, Junior Researcher

G.B. Elyakov Pacific Institute of Bioorganic Chemistry, FEB RAS, Vladivostok, Russia
tanya.tasha@mail.ru

<https://orcid.org/0000-0002-9587-897X>

Alina P. Filshtein

Candidate of Sciences in Chemistry, Junior Researcher

G.B. Elyakov Pacific Institute of Bioorganic Chemistry, FEB RAS, Vladivostok, Russia
alishichka@mail.ru

<https://orcid.org/0009-0000-6293-6582>

Alexandra S. Kuzmich

Researcher

G.B. Elyakov Pacific Institute of Bioorganic Chemistry, FEB RAS, Vladivostok, Russia
assavina@mail.ru

<https://orcid.org/0000-0001-5358-5880>

Oleg V. Chernikov

Candidate of Sciences in Biology, Deputy Director

G.B. Elyakov Pacific Institute of Bioorganic Chemistry, FEB RAS, Vladivostok, Russia
chernikov@piboc.dvo.ru

<https://orcid.org/0000-0002-3076-3637>

Abstract. Interest in marine organisms is due to the high content of biologically active substances in them, which are objects of fundamental and applied biomedical research and are effective in the development of therapeutic and prophylactic agents against a wide range of diseases. The laboratory of chemistry of non-infectious immunity of PIBOC FEB RAS conducts research on the screening, isolation, structure determination, study of physicochemical properties and biological activity of lectins from marine invertebrates. Lectins of different carbohydrate specificity have been isolated from bivalve mollusks, the physiological role of which is to participate in the innate immunity of mollusks. These proteins have different biological activity, including antibacterial and antiproliferative.

Keywords: lectins, marine invertebrates, biological activity

For citation: Chikalovets I.V., Mizgina T.O., Filshtein A.P., Kuzmich A.S., Chernikov O.V. Marine invertebrate lectins: isolation, properties and biological activity. *Vestnik of the FEB RAS*. 2025;(1):104–119. (In Russ.). <http://dx.doi.org/10.31857/S0869769825010079>

Funding. The study was carried out within the framework of a state assignment (reg. No. 124032100017-5).

Введение

Морские биологические ресурсы все чаще используются в качестве источников получения новых физиологически активных веществ и объектов для фундаментальных и прикладных медико-биологических исследований. Интерес, который проявляют ученые многих стран к морским источникам, обусловлен прежде всего большим содержанием в них биологически активных веществ, которые эффективны при терапии и профилактике широкого спектра заболеваний [1].

Лектины – широко распространенные белки и гликопротеины, способные специфически и обратимо связывать углеводные структуры. Они нековалентно связываются с моно- и олигосахаридами, как с находящимися в растворе, так и с локализованными на клеточной поверхности. Лектины принимают участие в самых тонких процессах на клеточном, субклеточном и органном уровнях в живых организмах. Эти процессы включают клиренс гликопротеинов из циркуляторной системы, симбиотическую или патогенную адгезию микроорганизмов к тканям хозяина, специфическое связывание опухолевых клеток с клетками различных органов при метастазировании. Повсеместное существование лектинов в природе и их способность различать близкие по структуре углеводы в растворе и на клеточной поверхности обеспечивают неослабевающий интерес исследователей к изучению их биологических функций. Актуальность изучения этого класса соединений обусловлена широким применением лектинов как в медицине, так и в биоорганической химии и биотехнологии.

Морские организмы относятся к числу сравнительно новых источников лектинов. Основными эволюционно не связанными друг с другом классами лектинов морских беспозвоночных являются лектины С-типа (CTL), галектины (ранее лектины S-типа), лектины R-типа (RTL), F-типа (FTL), H-типа (HTL), P-типа (PTL), I-типа (ITL), лектины, связывающие рамнозу (RBL), фиколины и др. [2]. Показано, что лектины морских беспозвоночных обладают способностью связывать специфические углеводы, проявляя при этом уникальные биологические свойства, такие как агрегация эритроцитов, дрожжей, бактерий. Хотя лектины беспозвоночных в последнее время интенсивно исследуются, информация об источниках их выделения, структуре и свойствах ограничена по сравнению с лектинами из высших животных и наземных растений [3].

Поиск и выделение новых лектинов

Выделение, установление структуры, изучение физико-химических свойств и биологической активности лектинов из морских гидробионтов является предметом исследований, проводимых в лаборатории химии неинфекционного иммунитета ТИБОХ ДВО РАН.

Моллюски – это тип морских беспозвоночных, которые представляют особый интерес как источник новых потенциальных биологически активных соединений. Моллюски составляют 7% животных на планете и занимают второе место по численности среди живых

организмов. Японское море является самым богатым из морей России по количеству видов животных и растений и включает 163 вида двустворчатых моллюсков [4].

На сегодняшний день из морских двустворчатых моллюсков был выделен ряд молекул с разнообразными биологическими функциями, таких как антимикробные пептиды, низкомолекулярные биорегуляторы, полисахариды и др. Лектины моллюсков являются хорошо известными биомолекулами с противоопухолевой, антифунгальной, антибактериальной и противовирусной активностями [5]. Взаимодействие лектинов с гликанами часто лежит в основе различных терапевтических стратегий. Благодаря большому структурному разнообразию и многофункциональной роли лектины обладают огромным потенциалом для применения в современной биотехнологии и медицине [6, 7].

В результате проведенного на морской экспериментальной станции ТИБОХ ДВО РАН поиска потенциальных источников лектинов были выбраны широко распространенные на Дальнем Востоке, ранее не изученные двустворчатые моллюски: мидии *Crenomytilus grayanus* и *Mytilus trossulus*, глицимерис *Glycymeris yessoensis*.

Среди множества различных методов выделения и очистки белков аффинная хроматография является одним из наиболее селективных, быстрых и простых способов очистки лектинов. Она основана на обратимом и специфическом связывании белка с его углеводным лигандом. Как правило, такой метод является крайне эффективным и позволяет получить чистый препарат белка в одну стадию. Реже требуется комбинированный подход и применение классических методов очистки белковых молекул – гель-проникающая и ионообменная хроматографии [8].

Методом аффинной хроматографии на гидролизованной сефарозе были выделены два Gal/GalNAc-специфичных лектина CGL (из экстракта мантии мидии *C. grayanus*) [9] и MTL (из экстракта мантии мидии *M. trossulus*) [10]. Установление первичной структуры этих белков выявило, что лектины обладают уникальной аминокислотной последовательностью, не имеющей гомологии с известными классами, и являются представителями нового семейства лектинов – митилектины [11].

Для двустворчатого моллюска *G. yessoensis* наибольшая лектинная активность, согласно скринингу, была обнаружена в гемолимфе. Методом аффинной хроматографии в объеме из гемолимфы были выделены три лектина разной углеводной специфичности. Рамнозоспецифичный лектин (GYL-R), относящийся к семейству рамнозосвязывающих лектинов (RBL) [12], а также два лектина С-типа различной углеводной специфичности: маннан-связывающий GYLman [13] и муцин-специфичный GYL [14].

Защитные функции лектинов

Двустворчатые моллюски представляют собой уязвимую группу морской фауны, так как являясь малоподвижными фильтрующими организмами, способными аккумулировать большое количество макро- и микроорганизмов из водной среды. Это может привести к накоплению потенциальных патогенов (бактерий, вирусов, грибов, паразитов) в организме моллюска. Из-за отсутствия иммунитета на основе антител защита моллюсков и других беспозвоночных от патогенной инфекции зависит исключительно от различных патоген-распознающих рецепторов (PPR). PPR, такие как лектины, цитокины, синтазы оксида азота и антимикробные пептиды, составляют врожденную иммунную систему моллюсков. Среди них лектины играют решающую роль за счет высокоспецифичного распознавания различных углеводов, находящихся на клеточной поверхности микроорганизмов – патоген-ассоциированных молекулярных паттернов (ПАМП), группы молекул, характерных для патогенов, но отсутствующих в организме хозяина. Узнавание образов патогенности и стимулирование запуска серии защитных иммунных реакций является основой во врожденном иммунитете [15]. Результат подобного рода взаимодействий – активация клеточных и гуморальных эффекторных систем, направленных на элиминацию патогена из внутренней среды организма. Лектины взаимодействуют со специфическими лигандами, что приводит к активации циркулирующих клеток, их направленной миграции в место проникновения патогена и запуску процесса фагоцитоза. Если лектины имеют сывороточную локализацию, то они могут повышать эффективность фагоцитоза, выполняя функции опсоинов [16].

Широкое распространение лектинов в гемолимфе и мантии моллюсков свидетельствует о том, что они играют важную роль в иммунной защите животного от инфицирования патогенными микроорганизмами. Методом твердофазного лектин-ферментного анализа (ТЛФА) была изучена способность выделенных лектинов распознавать основные группы условно патогенных микроорганизмов, имеющих филогенетически по-разному устроенную клеточную мембрану. Для этого были выбраны грамположительные (*Staphylococcus aureus* и *Bacillus subtilis*) и грамотрицательные (*Escherichia coli* и *Vibrio proteolyticus*) бактерии, а также дрожжевые грибы *Candida albicans*.

CGL высокоспецифично связывается с грамотрицательными бактериями *E. coli* и *V. Proteolyticus* [17]. MTL, в отличие от CGL, взаимодействует с такими микроорганизмами, как *S. aureus*, *E. coli*, *C. albicans* [18]. GYL-R высокоспецифично связывается с грамотрицательной бактерией *E. coli* и обладает минимальной аффинностью по отношению к остальным микроорганизмам. GYL обладает широким спектром связывания микробов, взаимодействуя со всеми протестированными типами микроорганизмов с разной, близкой по значениям, интенсивностью [14]. GYLman специфично связывает как грамположительные (*S. aureus*, *B. subtilis*), так и грамотрицательные (*E. coli*, *V. proteolyticus*) бактерии, а также дрожжи *C. albicans*, что предполагает его широкий спектр распознавания патогенов [13]. Методом ингибирования связывания установлено, что взаимодействие с микроорганизмами идет по лектинному пути.

Потенциальными мишенями для связывания лектинов с клеточной стенкой микроорганизмов могут выступать четыре отдельные макромолекулы или их комплекс, которые составляют основные элементы ПАМП у различных патогенов. Например, липополисахарид (ЛПС), пептидогликан являются основными бактериальными ПАМП, β -глюкан и маннан – типичные компоненты клеточных стенок грибов.

Принадлежность исследуемых лектинов к PPP определяли, изучая их способность связываться с основными видами ПАМП (ЛПС *E. coli* O111:B4, пептидогликаном *S. aureus*, α -D-маннаном *S. cerevisiae*, β -1,3-глюканом *E. gracilis*). Методом ТЛФА показано, что лектины проявляют концентрационно-зависимое связывание со всеми исследуемыми ПАМП в следующей последовательности:

CGL	ЛПС > β -1,3-глюкан > пептидогликан > α -D-маннан
MTL	пептидогликан > β -1,3-глюкан > α -D-маннан > ЛПС
GYL-R	ЛПС > пептидогликан > α -D-маннан > β -1,3-глюкан
GYL	пептидогликан > ЛПС > β -1,3-глюкан > α -D-маннан
GYLman	α -D-маннан > пептидогликан > ЛПС > β -1,3-глюкан

Методом ингибирования связывания установлено, что взаимодействие с ПАМП идет по лектинному пути.

Результаты взаимодействия лектинов с ПАМП хорошо коррелируют с данными по связыванию лектинов с микроорганизмами, которое происходит по пути углевод-белкового распознавания. Ингибирование связывания специфическими моносахаридами указывает, что взаимодействие идет через углеводсвязывающие сайты лектинов. Таким образом, наши данные подтверждают принадлежность CGL, MTL, GYL-R, GYL, GYLman к паттерн-распознающим рецепторам.

Благодаря мультидоменной структуре многие лектины не только связывают специфические лиганды на поверхности микроорганизмов, но и агглютинируют клетки. Агглютинация играет решающую роль в устранении потенциальных патогенов у морских беспозвоночных [19].

Взаимодействие лектинов с микроорганизмами в растворе было исследовано методом микроскопического анализа. В результате были выявлены крупные уплотненные конгломераты, которые и служили подтверждением агглютинирующих свойств лектинов (табл. 1). Предварительная инкубация лектинов со специфическими моносахаридами приводила к отсутствию агглютинирующей активности. Это указывает на то, что агглютинация осуществлялась через углеводсвязывающие сайты лектинов. Вероятно, таким образом лектины способны влиять на дальнейший рост и размножение микроорганизмов.

Таблица 1

Агглютинация микроорганизмов

Микроорганизм	CGL	MTL	GYL-R	GYL	GYLman
<i>E. coli</i>	++*	+	+++	++	+++
<i>V. proteolyticus</i>	+++	++	–	–	+
<i>B. subtilis</i>	+++	++	–	+++	+
<i>S. aureus</i>	++	++	–	+++	+
<i>C. albicans</i>	++	+++	–	–	+++

*Интенсивность агглютинации: сильная (+++), умеренная (++) и слабая (+), отсутствие агглютинации (–).

Таблица 2

Влияние лектинов на рост микроорганизмов

Бактерия	CGL	MTL	GYL-R	GYL	GYLman
<i>E. coli</i>	46	11	30	12	н.о.
<i>V. proteolyticus</i>	40	н.и.	н.и.	4	н.о.
<i>B. subtilis</i>	85	60	н.и.	16	н.о.
<i>S. aureus</i>	68	н.и.	н.и.	н.и.	н.о.

Примечание. Ингибирование (в %) роста бактериальной биомассы по сравнению с контролем (рост бактерий в отсутствие лектина); н.о. – не определяли; н.и. – не ингибирует.

Бактериостатические свойства лектинов в отношении микроорганизмов были изучены методом турбидиметрии (табл. 2). Клетки инкубировали в присутствии и отсутствие лектинов. Затем измеряли мутность раствора, соответствующую количеству клеток, и рассчитывали степень ингибирования роста бактериальной биомассы по сравнению с контролем (см. табл. 2). Установлено, что CGL оказывает наибольшее ингибирующее влияние на рост всех исследованных бактериальных клеток. Примечательно также, что все лектины в разной степени подавляли рост бактерии *E. coli*. На основании полученных результатов можно предположить, что исследуемые лектины входят в группу паттерн-распознающих рецепторов и являются компонентами иммунной системы, участвуя в защите организма беспозвоночных от воздействия внешних патогенов.

Влияние лектинов на опухолевые клетки

Растет интерес к медицинскому потенциалу лектинов в качестве противоопухолевых агентов [20]. Связано это с тем, что злокачественная трансформация сопровождается нарушением нормального хода гликозилирования и экспозицией на поверхности опухолевых клеток углеводных маркеров малигнизации. Лектины способны выявлять углеводные детерминанты, специфичные для гликоконъюгатов раковых клеток. Это позволяет использовать их в практической онкологии для ранней и дифференциальной диагностики заболевания. Кроме того, связываясь с углеводными лигандами на поверхности опухолевых клеток, они оказывают определенное влияние на их развитие и функционирование. Поэтому их можно использовать как противоопухолевые, канцерпревентивные и диагностические агенты [21]. Так, лектин, выделенный из съедобного гриба *Agaricus bisporus* (ABL), проявляет сильную антипролиферативную активность в отношении эпителиальных опухолевых клеток, но не обладает цитотоксической активностью против нормальных клеток [22].

Он узнает TF-антиген (антиген Thomsen–Friedenreich), дисахарид, хорошо известный клеточно-поверхностный маркер неопластических клеток, состоящий из Gal β 1-3GalNAc. Большинство лектинов, таких как ABL, которые рассматриваются в качестве кандидатов для медицинского использования, проявляют специфичность к β -связанным углеводам. Поэтому лектины, обладающие необычной лигандной специфичностью и проявляющие цитотоксический эффект в отношении опухолевых клеток, представляют особый интерес для исследователей.

Изучено влияние Gal/GalNAc-специфичных лектинов CGL и MTL на пролиферацию линий клеток различных типов опухолей кишечника и молочной железы человека: аденокарцинома прямой кишки DLD-1, карцинома толстой кишки HCT-116, аденокарцинома толстой кишки HT-29, аденокарцинома молочной железы MCF-7 и MDA-MB-231, карцинома молочной железы T-47D. Известно, например, что линии MCF-7 и T-47D имеют на своей поверхности как α - так и β -аномеры остатков терминальной галактозы. Как видно из рис. 1, оба лектина в разной степени обладают антипролиферативным эффектом в отношении исследованных линий клеток. Однако необходимо отметить, что IC₅₀ не достигается ни с одним из типов клеток. CGL оказался наиболее активен в отношении клеток аденокарциномы толстой кишки HT-29, а MTL – аденокарциномы молочной железы MCF-7 и MDA-MB-231.

Показано, что, связываясь с поверхностью клеток, лектины препятствуют дальнейшему их расплыванию, что приводит к ингибированию пролиферации (рис. 2). Таким образом, лектины влияют на адгезию опухолевых клеток. CGL оказался наиболее активен по сравнению с MTL в отношении клеток всех типов, использованных в эксперименте.

Эффект, оказываемый на любые клетки, в том числе опухолевые, сопровождается регулированием сигнальных путей внутри клетки. Одной из контрольных точек в прогрессии клеточного цикла в фазе подготовки к митозу (фаза G2) и/или митоза (фаза M) является образование комплекса циклина B1/cdc2 (cdk1). Циклин B1 является членом семейства белков, которые активируют специфические циклин-зависимые киназы, необходимые для прохождения клеточного цикла. Вступление всех эукариотических клеток в митоз регулируется активацией cdc2 при переходе G2/M. Процесс контролируется на нескольких этапах, включая связывание циклина B1 и фосфорилирование cdc2 по Thr161 [23]. Однако критическим регуляторным шагом в активации cdc2 во время прогрессии в митоз является дефосфорилирование cdc2 по Thr14 и Tyr15 с помощью cdc25C [24]. Фосфорилирование по Thr14 и Tyr15 приводит к ингибированию cdc2. Cdc25C – это протеинфосфатаза, ответственная за дефосфорилирование и активацию cdc2 [25]. Киназа контрольной точки

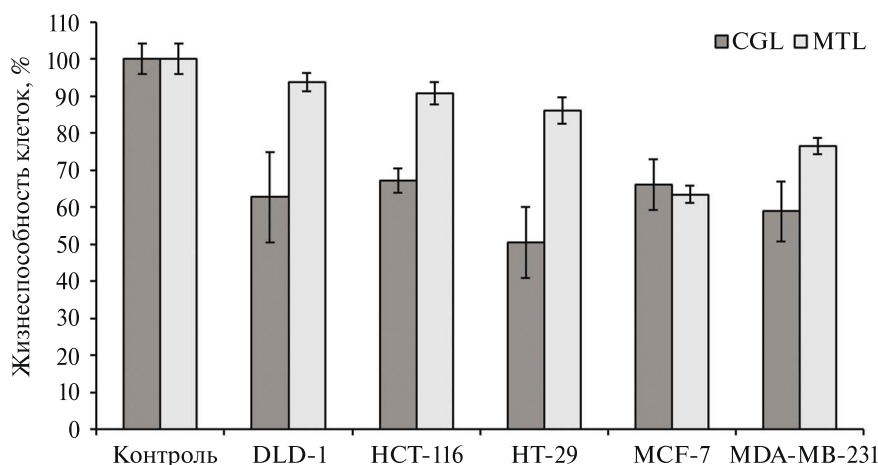


Рис. 1. Антипролиферативное действие лектинов в отношении клеточных линий различных типов опухолей кишечника и молочной железы человека, установленное с помощью MTS-теста. Данные представлены как среднее значение $\pm$ стандартное отклонение (n = 3)

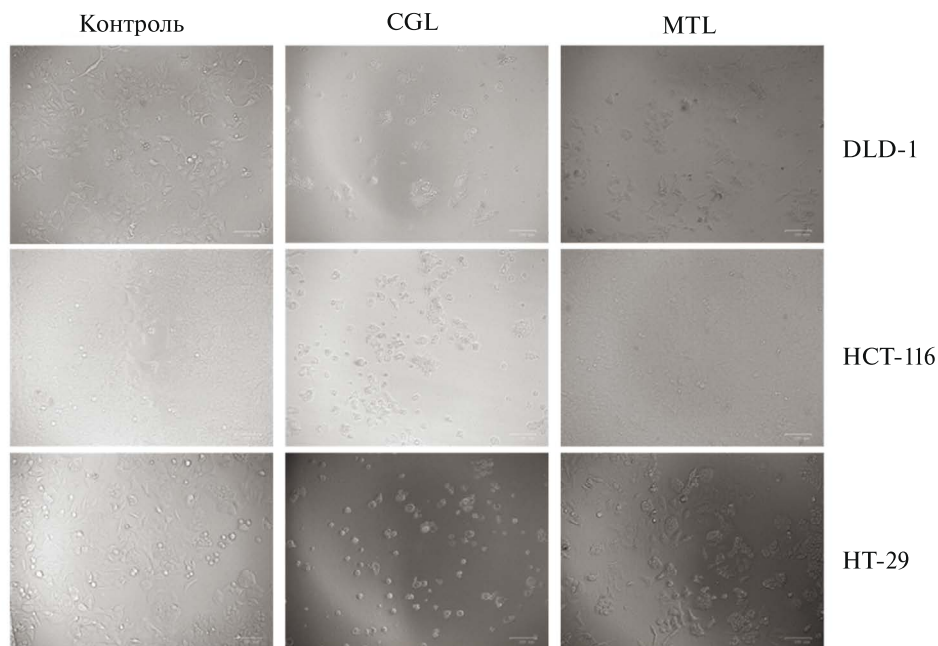


Рис. 2. Влияние лектинов на адгезию опухолевых клеток. Клетки инкубировали в присутствии (100 мкг/мл) или в отсутствие (контроль) лектинов. Результаты детектировали с помощью светового микроскопа

Chk1 фосфорилирует cdc25C по Ser216 в ответ на повреждение ДНК [26]. Активация Chk1 включает фосфорилирование по Ser317 и Ser345 с помощью ATM/ATR с последующим автофосфорилированием Ser296. Активированный Chk1 может инактивировать cdc25C через фосфорилирование по Ser216, блокируя активацию cdc2 и переход в митоз [27].

Методом вестерн блоттинга изучено влияние лектинов на основные белки, участвующие в прогрессии клеточного цикла в фазе G2/М. Как видно из рис. 3, обработка клеток HT-29 лектином CGL приводит к уменьшению общего содержания cdc2, при этом увеличивается содержание его фосфорилированной формы (p-cdc2), что приводит к его инактивации. В это же время происходит ингибирование синтеза циклина В1. Также уменьшается общее содержание Chk1 и cdc25C. Все это в совокупности ведет к блокировке образования комплекса циклина В1/cdc2 и аресту клеточного цикла в фазе G2/М. MTL не показал влияния на клеточный цикл данного типа клеток (см. рис. 3).

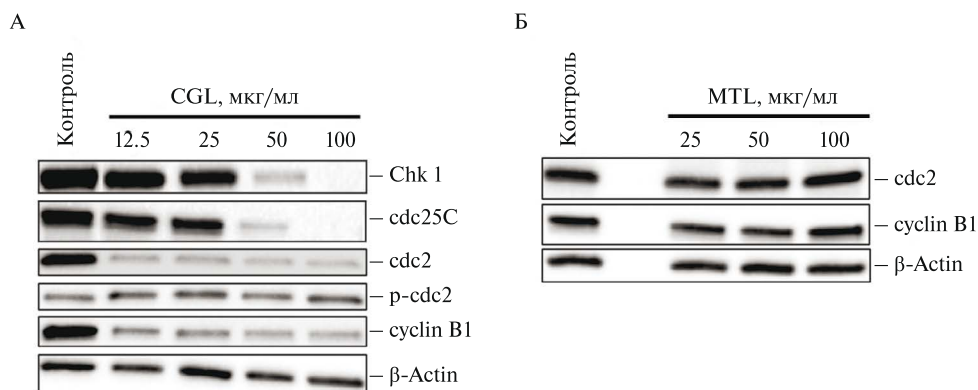


Рис. 3. Влияние CGL (А) и MTL (Б) на клеточный цикл клеток HT-29

Отличие во влиянии лектинов может зависеть от механизма действия. Активные формы кислорода (АФК) являются одними из важных вторичных мессенджеров при передаче сигналов в клетке, которые регулируют многие биологические процессы. Повышение внутриклеточного уровня АФК до высокотоксичных значений является механизмом индукции гибели клеток. Изучено влияние лектинов на синтез АФК опухолевыми клетками. Клетки, обработанные лектинами в различных концентрациях, были окрашены с помощью 2',7'-дихлофлуоресцеин диацетата (DCFDA) и определен уровень флуоресценции на планшетном флуориметре. Альтернативный эксперимент был выполнен с детекцией АФК

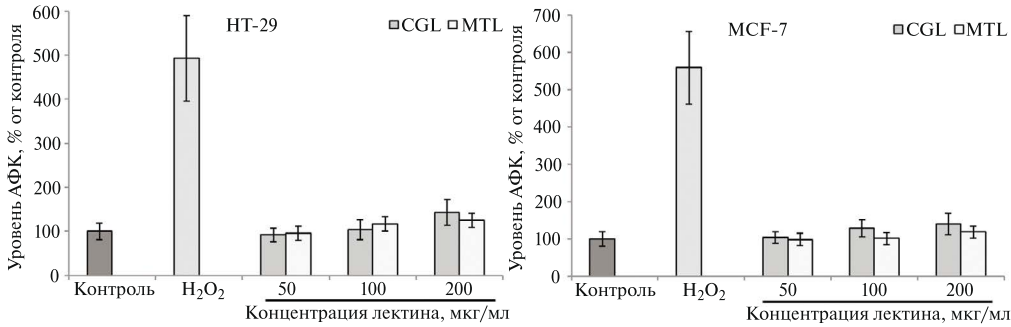


Рис. 4. Влияние лектинов на продукцию АФК в опухолевых клетках HT-29 и MCF-7. Данные представлены как среднее значение $\pm$ стандартное отклонение (n = 3)

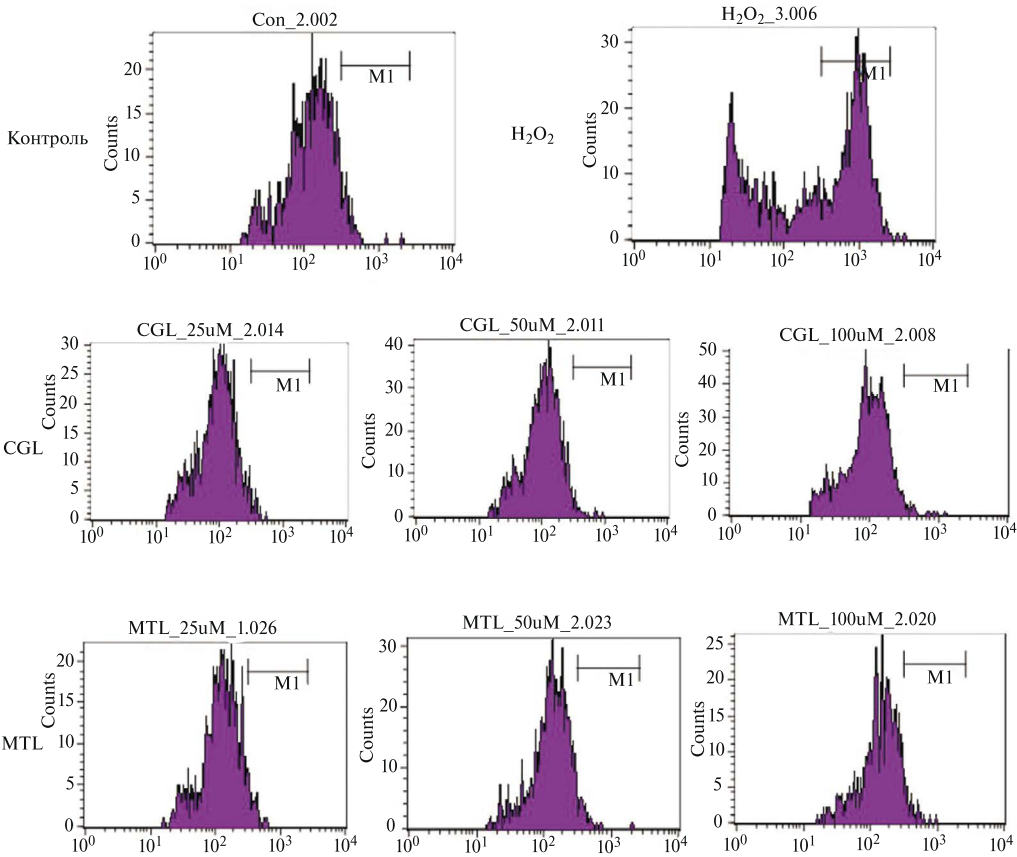


Рис. 5. Влияние лектинов на продукцию АФК в опухолевых клетках Raji

методом проточной цитофлуориметрии. Как видно из рис. 4, оба лектина незначительно увеличивали концентрацию АФК в клетках HT-29 и MCF-7 по сравнению с положительным контролем перекисью водорода (H_2O_2).

Аналогичная картина наблюдалась по данным проточной цитофлуориметрии на клетках Raji (рис. 5). Это может говорить, что влияние лектинов на пролиферацию опухолевых клеток не опосредовано АФК.

Также это подтверждает эксперимент, в котором было исследовано влияние CGL и MTL на пролиферацию опухолевых клеток *in vitro* с помощью MTS-метода в присутствии известного сквенджера АФК N-ацетилцистеина (NAC). NAC не отменял существенно антипролиферативное действие лектинов на опухолевые клетки (рис. 6), что подтверждает идею о механизме действия, не связанном с индукцией АФК.

Гомеостаз гибели и выживания клеток тесно контролируется апоптозом и аутофагией; однако связь между этими процессами является двухсторонней и зависит от типа клеток. Аутофагия может индуцировать апоптоз в клетках. Но есть случаи, когда ингибирование аутофагии, наоборот, усиливает апоптоз клетки. Влияние CGL на аутофагию было уста-

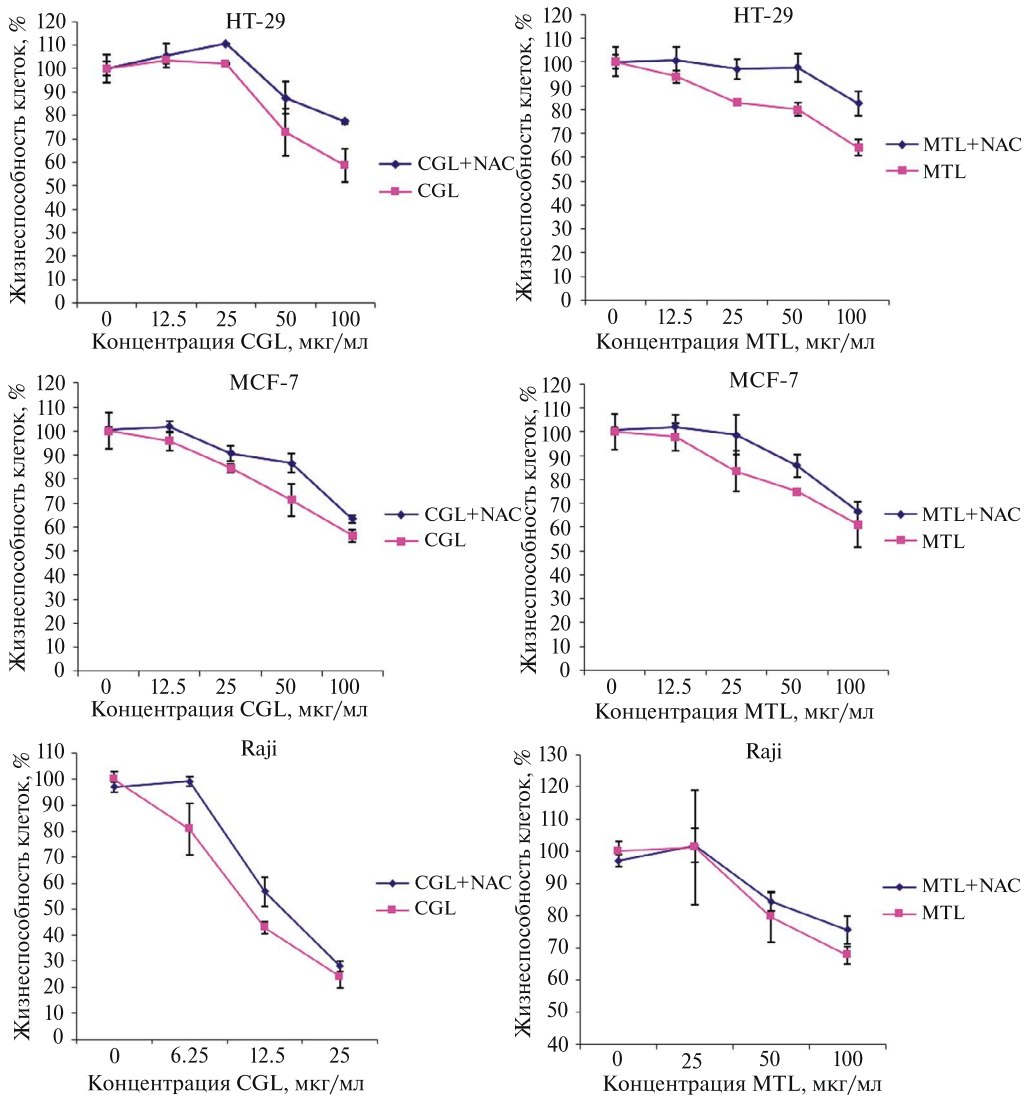


Рис. 6. Влияние лектинов на пролиферацию опухолевых клеток HT-29, MCF-7 и Raji в присутствии NAC

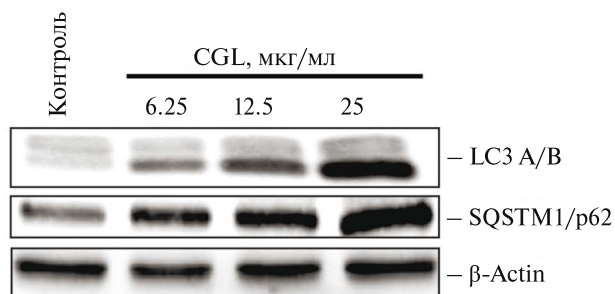


Рис. 7. Влияние лектина CGL на аутофагию в клетках Raji лимфомы Беркитта

новлено с помощью вестерн блоттинга путем анализа экспрессии основных маркеров аутофагии – белков LC3 A/B и SQSTM1/p62. Оба данных белка участвуют в формировании аутофагосомы. Как видно из рис. 7, CGL активирует эти белки в клетках линии Raji, что свидетельствует о запуске процесса аутофагии. Основным стимулом к усилению процессов аутофагии может служить нехватка питательных веществ, наличие в цитоплазме поврежденных органелл, частично денатурировавших белков и их агрегатов. Однако недавние исследования показали, что аутофагия также нужна для онкоген-индуцируемого старения [28]. Старение представляется стадией безвозвратной остановки клеточного цикла, ограничивающей процесс деления поврежденной клетки. Показано, что аутофагия активируется в процессе старения, вызванного повреждениями ДНК, что подтверждает супрессорную функцию аутофагии в канцерогенезе. Возможно, активирование главных маркеров аутофагии происходит за счет повреждения лектином ДНК и остановки клеточного цикла.

К основным свойствам всех злокачественных опухолей относят повышенную способность к пролиферации, утрату способности к полной дифференцировке и апоптотической гибели, а также инвазивный рост и метастазирование.

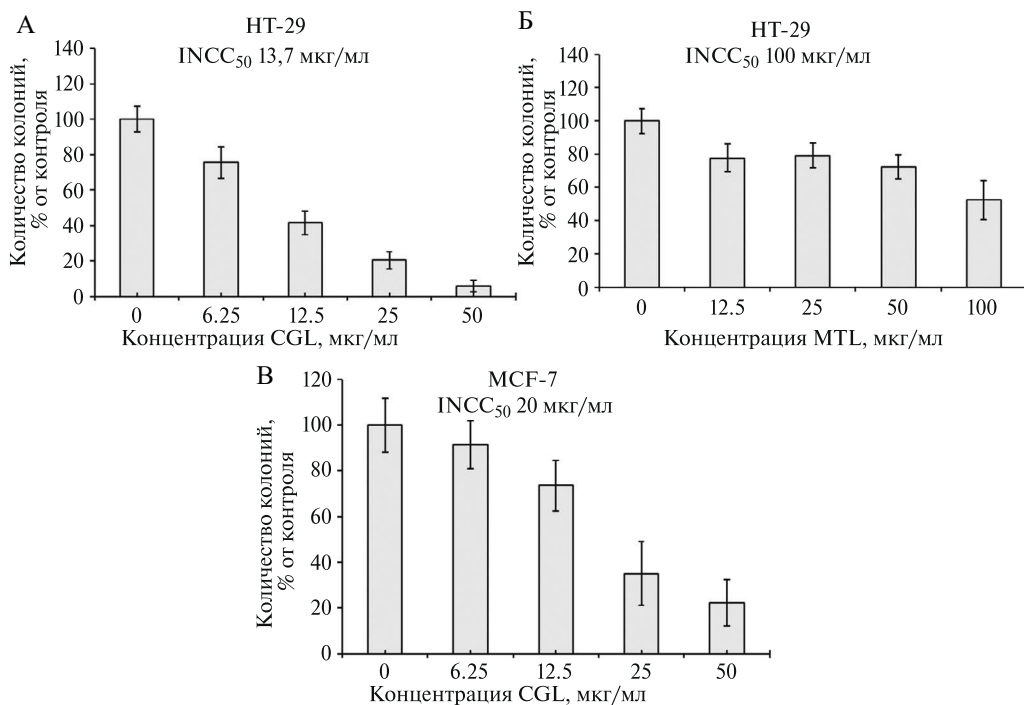


Рис. 8. Влияние CGL (А, В) и MTL (Б) на опухолевые клетки линий HT-29 и MCF-7, установленное методом мягкого агара

С помощью метода мягкого агара исследовали действие лектинов CGL и MTL на самопроизвольное формирование и рост колоний опухолевых клеток человека HT-29 и MCF-7. Лектины ингибировали самопроизвольное формирование и рост колоний опухолевых клеток человека в различной степени (рис. 8). CGL оказался наиболее эффективным при обработке всех исследуемых линий опухолевых клеток человека. CGL значительно ингибировал самопроизвольное образование и рост колоний опухолевых клеток HT-29 и MCF-7 с $INCC_{50}$ 13,7 и 20 мкг/мл соответственно ($INCC_{50}$ – концентрация, приводящая к 50%-ному ингибированию образования колоний). MTL ингибировал самопроизвольное образование колоний гораздо в меньшей степени, и $INCC_{50}$ достигалась лишь в максимальной концентрации 100 мкг/мл.

Изучено влияние CGL на миграцию и метастазирование опухолевых клеток с использованием технологии xCELLigence RTCA DP, которая заключается в детекции в реальном времени изменений сопротивления микроэлектронных датчиков, встроенных в мембрану, через которую клетки мигрируют. Как видно на рис. 9, лектин ингибирует миграцию опухолевых клеток HT-29 и Raji (лимфома Беркитта) во всех тестируемых концентрациях. При этом значительный эффект лектина на клетки Raji наблюдается уже в концентрации 6,25 мкг/мл, что согласуется с IC_{50} 6,81 мкг/мл, установленной ранее с помощью MTS-метода [29]. Наиболее эффективное действие на клетки HT-29 CGL проявляет в максимальной концентрации (100 мкг/мл), как и в случае с клетками MCF-7.

Также для оценки влияния CGL на миграцию и метастазирование опухолевых клеток был использован метод «заращение царапины», который основан на повреждении монослоя клеток нанесением царапины и оценки площади зарастания царапины под действием лектина. Как видно на рис. 10, лектин препятствует образованию монослоя клеток уже при концентрации 3,125 мкг/мл.

Исследования также показали, что некоторые клеточные линии рака простаты (PC-3, DU145, 22Rv1, LNCaP) подвержены цитотоксическому действию CGL, однако наибольшую чувствительность проявляли лекарственно чувствительные клетки LNCaP

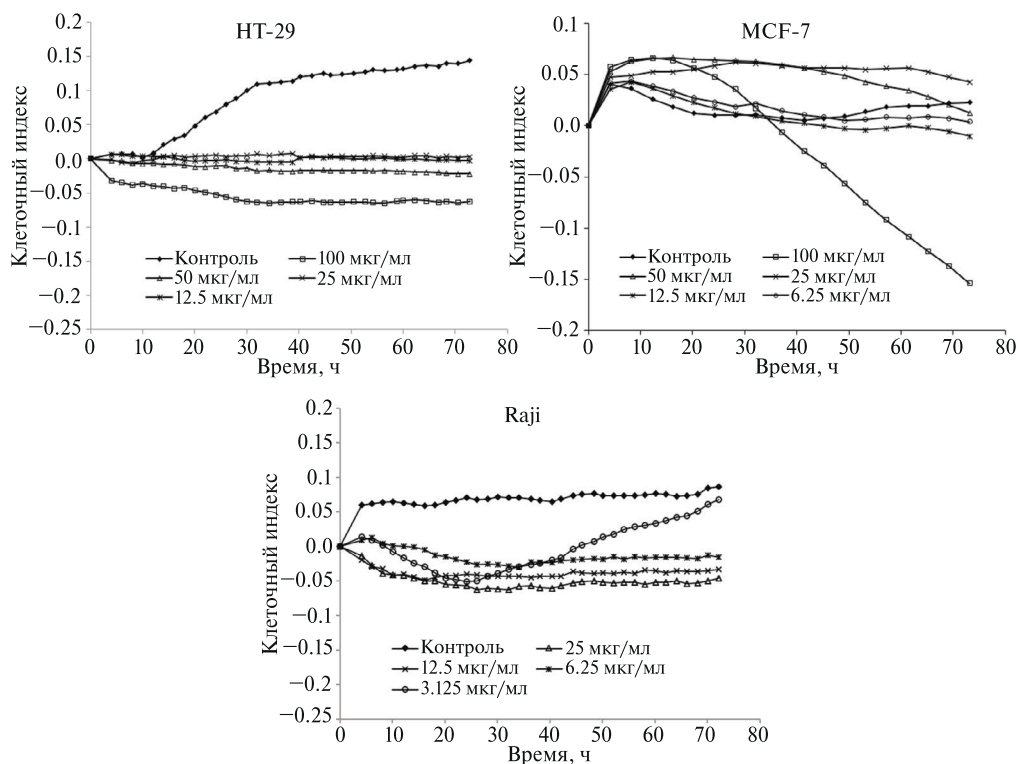


Рис. 9. Влияние CGL на миграцию опухолевых клеток линий HT-29, Raji и MCF-7

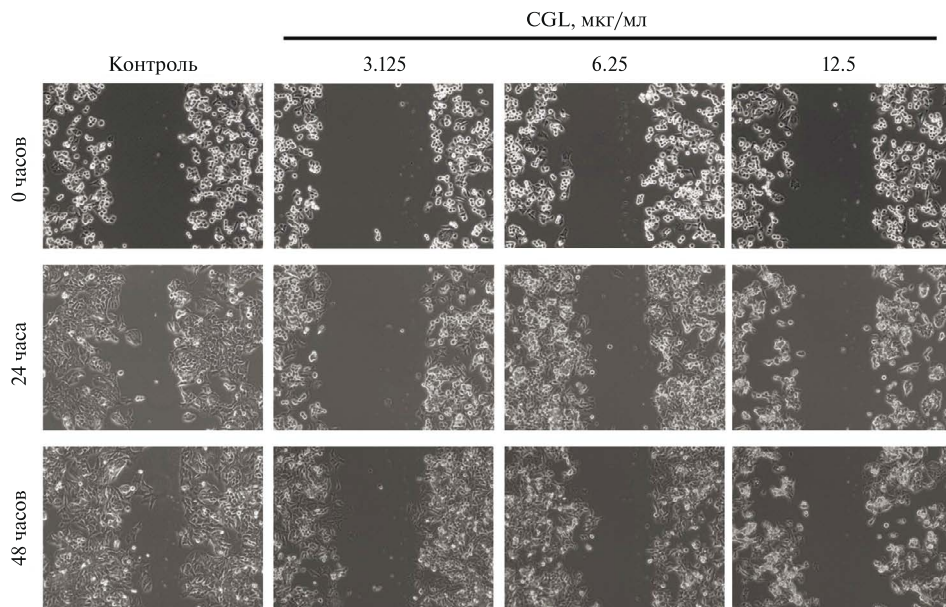


Рис. 10. Влияние CGL на миграцию опухолевых клеток линии HT-29 методом «зарастания царапин»

(IC_{50} 11,3 мкг/мл). MTL оказался менее активен в отношении перечисленных линий опухолевых клеток, IC_{50} достигался в концентрациях более 500 мкг/мл. В то же время стоит отметить, что нормальные неопухолевые клетки человека НЕК293 были подвержены цитотоксическому эффекту лектинов в меньшей степени по сравнению с опухолевыми (CGL – IC_{50} 108,1 мкг/мл; MTL – IC_{50} >500 мкг/мл).

Таким образом, CGL и MTL способны в разной степени влиять на пролиферацию опухолевых клеток человека. Оба лектина ингибируют образование колоний и влияют на миграцию опухолевых клеток. Механизм действия лектинов не опосредован АФК, а заключается в блокировке ключевых точек клеточного цикла и аутофагии опухолевых клеток.

СПИСОК ИСТОЧНИКОВ

1. Freitas A.C., Rodrigues D., Rocha-Santos T.A.P., Gomes A.M.P., Duarte A.C. Marine biotechnology advances towards applications in new functional foods // *Biotechnol. Adv.* 2012. Vol. 30, N6. P. 1506–1515.
2. Ogawa T., Watanabe M., Naganuma T., Muramoto K. Diversified carbohydrate-binding lectins from marine resources // *J. Amino Acids*. 2011. Vol. 2011. P. 838914.
3. Bonnardel F., Mariethoz J., Salentin S., Robin X., Schroeder M., Perez S., Lisacek F.D.S., Imberty A. UniLectin3D, a database of carbohydrate binding proteins with curated information on 3D structures and interacting ligands // *Nucleic Acids Res.* 2019. Vol. 47, N D1. P. D1236–D1244.
4. Лутаенко К.А., Волвенко И.Е. Малый атлас двустворчатых моллюсков залива Петра Великого (Японское море). 2-е изд. / под ред. А.В. Адрианова. Владивосток: Дальневосточный федеральный университет, 2022. 138 с.
5. Ahmmmed M.K., Bhowmik S., Giteru S.G., Zilani M.N.H., Adadi P., Islam S.S., Kanwugu O.N., Haq M., Ahmmmed F., Ng C.C.W., Chan Y.S., Asadujjaman M., Chan G.H.H., Naude R., Bekhit A.E.D.A., Ng T.B., Wong J.H. An update of lectins from marine organisms: characterization, extraction methodology, and potential biofunctional applications // *Mar. Drugs*. 2022. Vol. 20, N7. 430.
6. Cheung R.C., Wong J.H., Pan W., Chan Y.S., Yin C., Dan X., Ng T.B. Marine lectins and their medicinal applications // *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 2015. Vol. 99, N9. P. 3755–3773.
7. Chettri D., Boro M., Sarkar L., Verma A.K. Lectins: biological significance to biotechnological application // *Carbohydr. Res.* 2021. Vol. 506. 108367.

8. Nascimento Kel.S., Cunha A.I., Nascimento Kyr.S., Cavada B.S., Azevedo A.M., Aires-Barros M.R. An overview of lectins purification strategies // J. Mol. Recognit. 2012. Vol. 25, N11. P. 527–541.
9. Belogortseva N.I., Molchanova V.I., Kurika A. V, Skobun A.S., Glazkova V.E. Isolation and characterization of new GalNAc/Gal-specific lectin from the sea mussel *Crenomytilus grayanus* // Comp. Biochem. Physiol. C. Pharmacol. Toxicol. Endocrinol. 1998. Vol. 119, N1. P. 45–50.
10. Chikalovets I.V., Kondrashina A.S., Chernikov O.V., Molchanova V.I., Luk'yanov P.A. Isolation and general characteristics of lectin from the mussel *Mytilus trossulus* // Chem. Nat. Compd. 2013. Vol. 48, N6. P. 1058–1061.
11. Chikalovets I., Filshtein A., Molchanova V., Mizgina T., Lukyanov P., Nedashkovskaya O., Hua K.-F.K.-F., Chernikov O. Activity dependence of a novel lectin family on structure and carbohydrate-binding properties // Molecules. 2019. Vol. 25, N1. 150.
12. Mizgina T.O., Chikalovets I.V., Bulanova T.A., Molchanova V.I., Filshtein A.P., Ziganshin R.H., Rogozhin E.A., Shilova N.V., Chernikov O.V. New L-rhamnose-binding lectin from the bivalve *Glycymeris yessoensis*: purification, partial structural characterization and antibacterial activity // Mar. Drugs. 2023. Vol. 22, N1. 27.
13. Mizgina T.O., Chikalovets I.V., Molchanova V.I., Kokoulin M.S., Filshtein A.P., Sidorin E.V., Chernikov O.V. Lectin of the bivalve *Glycymeris yessoensis* as a pattern recognition receptor // Russ. J. Bioorganic Chem. 2020. Vol. 46, N6. P. 1187–1197.
14. Mizgina T.O., Chikalovets I.V., Molchanova V.I., Ziganshin R.H., Chernikov O.V. Identification and characterization of a novel lectin from the clam *Glycymeris yessoensis* and its functional characterization under microbial stimulation and environmental stress // Mar. Drugs. 2021. Vol. 19, N9. 474.
15. Wang W., Song X., Wang L., Song L. Pathogen-derived carbohydrate recognition in molluscs immune defense // Int. J. Mol. Sci. 2018. Vol. 19, N3. 721.
16. Song L., Wang L., Qiu L., Zhang H. Bivalve immunity // Adv. Exp. Med. Biol. 2010. Vol. 708. P. 44–65.
17. Kovalchuk S.N., Chikalovets I.V., Chernikov O.V., Molchanova V.I., Li W., Rasskazov V.A., Lukyanov P.A. cDNA cloning and structural characterization of a lectin from the mussel *Crenomytilus grayanus* with a unique amino acid sequence and antibacterial activity // Fish Shellfish Immunol. 2013. Vol. 35, N4. P. 1320–1324.
18. Chikalovets I.V., Kovalchuk S.N., Litovchenko A.P., Molchanova V.I., Pivkin M.V., Chernikov O.V. A new Gal/GalNAc-specific lectin from the mussel *Mytilus trossulus*: structure, tissue specificity, antimicrobial and antifungal activity // Fish Shellfish Immunol. 2016. Vol. 50. P. 27–33.
19. Nabi-Afjadi M., Heydari M., Zalpoor H., Arman I., Sadoughi A., Sahami P., Aghazadeh S. Lectins and lectinobodies: potential promising antiviral agents // Cell. Mol. Biol. Lett. 2022. Vol. 27, N1. 37.
20. Liu Z., Luo Y., Zhou T.-T., Zhang W.-Z. Could plant lectins become promising anti-tumour drugs for causing autophagic cell death? // Cell Prolif. 2013. Vol. 46, N5. P. 509–515.
21. Hashim O.H., Jayapalan J.J., Lee C.S. Lectins: an effective tool for screening of potential cancer biomarkers // Peer J. 2017. Vol. 5, N9. e3784.
22. Carrizo M.E., Capaldi S., Perduca M., Irazoqui F.J., Nores G.A., Monaco H.L. The antineoplastic lectin of the common edible mushroom (*Agaricus bisporus*) has two binding sites, each specific for a different configuration at a single epimeric hydroxyl // J. Biol. Chem. 2005. Vol. 280, N11. P. 10614–10623.
23. Lorca T., Labbe J.C., Devault A., Fesquet D., Capony J.P., Cavadore J.C., Le Bouffant F., Doree M. Dephosphorylation of cdc2 on threonine 161 is required for cdc2 kinase inactivation and normal anaphase // EMBO J. 1992. Vol. 11, N7. P. 2381–2390.
24. Norbury C., Blow J., Nurse P. Regulatory phosphorylation of the p34cdc2 protein kinase in vertebrates // EMBO J. 1991. Vol. 10, N11. P. 3321–3329.
25. Jessus C., Ozon R. Function and regulation of cdc25 protein phosphate through mitosis and meiosis // Prog. Cell Cycle Res. 1995. Vol. 1. P. 215–228.
26. Blasina A., Van de Weyer I., Laus M.C., Luyten W.H.M.L., Parker A.E., McGowan C.H. A human homologue of the checkpoint kinase Cds1 directly inhibits Cdc25 phosphatase // Curr. Biol. 1999. Vol. 9, N1. P. 1–10.
27. Zeng Y., Forbes K.C., Wu Z., Moreno S., Piwnicka-Worms H., Enoch T. Replication checkpoint requires phosphorylation of the phosphatase Cdc25 by Cds1 or Chk1 // Nature. 1998. Vol. 395, N6701. P. 507–510.
28. Young A.R.J., Narita M., Ferreira M., Kirschner K., Sadaie M., Darot J.F.J., Tavaré S., Arakawa S., Shimizu S., Watt F.M., Narita M. Autophagy mediates the mitotic senescence transition // Genes Dev. 2009. Vol. 23, N7. P. 798–803.

29. Chernikov O., Kuzmich A., Chikalovets I., Molchanova V., Hua K.-F. Lectin CGL from the sea mussel *Crenomytilus grayanus* induces Burkitt's lymphoma cells death via interaction with surface glycan // *Int. J. Biol. Macromol.* 2017. Vol. 104. P. 508–514.

REFERENCES

- Freitas A.C., Rodrigues D., Rocha-Santos T.A.P., Gomes A.M.P., Duarte A.C. Marine biotechnology advances towards applications in new functional foods. *Biotechnol. Adv.* 2012;30(6):1506–1515.
- Ogawa T., Watanabe M., Naganuma T., Muramoto K. Diversified carbohydrate-binding lectins from marine resources. *J. Amino Acids.* 2011;2011:838914.
- Bonnardel F., Mariethoz J., Salentin S., Robin X., Schroeder M., Perez S., et al. UniLectin3D, a database of carbohydrate binding proteins with curated information on 3D structures and interacting ligands. *Nucleic. Acids Res.* 2019;47(D1):D1236–D1244.
- Lutaenko K.A., Volvenko I.E. Malyi atlas dvustvorchatykh mollyuskov zaliva Petra Velikogo (Yaponskoe more) = [Small atlas of bivalve mollusks of the Peter the Great Gulf (Sea of Japan)]. 2nd ed. Vladivostok: Dal'nevostochnyi Federal'nyi Universitet; 2022. 138 s. (In Russ.).
- Ahmed M.K., Bhowmik S., Giteru S.G., Zilani M.N.H., Adadi P., Islam S.S., et al. An Update of lectins from marine organisms: characterization, extraction methodology, and potential biofunctional applications. *Mar. Drugs.* 2022;20(7). 430.
- Cheung R.C., Wong J.H., Pan W., Chan Y.S., Yin C., Dan X., et al. Marine lectins and their medicinal applications. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 2015;99(9):3755–3773.
- Chettri D., Boro M., Sarkar L., Verma A.K. Lectins: Biological significance to biotechnological application. *Carbohydr. Res.* 2021;506. 108367.
- Nascimento Kel.S., Cunha A.I., Nascimento Kyr.S., Cavada B.S., Azevedo A.M., Aires-Barros M.R. An overview of lectins purification strategies. *J. Mol. Recognit.* 2012;25(11):527–541.
- Belogortseva N.I., Molchanova V.I., Kurika A.V., Skobun A.S., Glazkova V.E. Isolation and characterization of new GalNAc/Gal-specific lectin from the sea mussel *Crenomytilus grayanus*. *Comp. Biochem. Physiol. C. Pharmacol. Toxicol. Endocrinol.* 1998;119(1):45–50.
- Chikalovets I.V., Kondrashina A.S., Chernikov O.V., Molchanova V.I., Luk'yanov P.A. Isolation and general characteristics of lectin from the mussel *Mytilus trossulus*. *Chem. Nat. Compd.* 2013;48(6):1058–1061.
- Chikalovets I., Filshtein A., Molchanova V., Mizgina T., Lukyanov P., Nedashkovskaya O., et al. Activity dependence of a novel lectin family on structure and carbohydrate-binding properties. *Molecules.* 2019;25(1). 150.
- Mizgina T.O., Chikalovets I.V., Bulanova T.A., Molchanova V.I., Filshtein A.P., Ziganshin R.H., et al. New L-rhamnose-binding lectin from the bivalve *Glycymeris yessoensis*: purification, partial structural characterization and antibacterial activity. *Mar. Drugs.* 2023;22(1). 27.
- Mizgina T.O., Chikalovets I.V., Molchanova V.I., Kokoulin M.S., Filshtein A.P., Sidorin E.V., et al. Lectin of the bivalve *Glycymeris yessoensis* as a pattern recognition receptor. *Russ. J. Bioorganic. Chem.* 2020;46(6):1187–1197.
- Mizgina T.O., Chikalovets I.V., Molchanova V.I., Ziganshin R.H., Chernikov O.V. Identification and characterization of a novel lectin from the clam *Glycymeris yessoensis* and its functional characterization under microbial stimulation and environmental stress. *Mar. Drugs.* 2021;19(9). 474.
- Wang W., Song X., Wang L., Song L. Pathogen-derived carbohydrate recognition in molluscs immune defense. *Int. J. Mol. Sci.* 2018;19(3). 721.
- Song L., Wang L., Qiu L., Zhang H. Bivalve immunity. *Adv. Exp. Med. Biol.* 2010;708:44–65.
- Kovalchuk S.N., Chikalovets I.V., Chernikov O.V., Molchanova V.I., Li W., Rasskazov V.A., et al. CDNA cloning and structural characterization of a lectin from the mussel *Crenomytilus grayanus* with a unique amino acid sequence and antibacterial activity. *Fish Shellfish Immunol.* 2013;35(4):1320–1324.
- Chikalovets I.V., Kovalchuk S.N., Litovchenko A.P., Molchanova V.I., Pivkin M.V., Chernikov O.V. A new Gal/GalNAc-specific lectin from the mussel *Mytilus trossulus*: structure, tissue specificity, antimicrobial and antifungal activity. *Fish Shellfish Immunol.* 2016;50:27–33.
- Nabi-Afjadi M., Heydari M., Zalpoor H., Arman I., Sadoughi A., Sahami P., et al. Lectins and lectinoids: potential promising antiviral agents. *Cell. Mol. Biol. Lett.* 2022;27(1). 37.
- Liu Z., Luo Y., Zhou T.-T., Zhang W.-Z. Could plant lectins become promising anti-tumour drugs for causing autophagic cell death? *Cell. Prolif.* 2013;46(5):509–515.

21. Hashim O.H., Jayapalan J.J., Lee C.S. Lectins: an effective tool for screening of potential cancer biomarkers. *Peer J.* 2017;5(9). e3784.
22. Carrizo M.E., Capaldi S., Perduca M., Irazoqui F.J., Nores G.A., Monaco H.L. The antineoplastic lectin of the common edible mushroom (*Agaricus bisporus*) has two binding sites, each specific for a different configuration at a single epimeric hydroxyl. *J. Biol. Chem.* 2005;280(11):10614–10623.
23. Lorca T., Labbe J.C., Devault A., Fesquet D., Capony J.P., Cavadore J.C., et al. Dephosphorylation of cdc2 on threonine 161 is required for cdc2 kinase inactivation and normal anaphase. *EMBO J.* 1992;11(7):2381–2390.
24. Norbury C., Blow J., Nurse P. Regulatory phosphorylation of the p34cdc2 protein kinase in vertebrates. *EMBO J.* 1991;10(11):3321–3329.
25. Jessus C., Ozon R. Function and regulation of cdc25 protein phosphate through mitosis and meiosis. *Prog. Cell. Cycle. Res.* 1995;1:215–28.
26. Blasina A., Van de Weyer I., Laus M.C., Luyten W.H.M.L., Parker A.E., McGowan C.H. A human homologue of the checkpoint kinase Cds1 directly inhibits Cdc25 phosphatase. *Curr. Biol.* 1999;9(1):1–10.
27. Zeng Y., Forbes K.C., Wu Z., Moreno S., Piwnicka-Worms H., Enoch T. Replication checkpoint requires phosphorylation of the phosphatase Cdc25 by Cds1 or Chk1. *Nature.* 1998;395(6701):507–510.
28. Young A.R.J., Narita M., Ferreira M., Kirschner K., Sadaie M., Darot J.F.J., et al. Autophagy mediates the mitotic senescence transition. *Genes Dev.* 2009;23(7):798–803.
29. Chernikov O., Kuzmich A., Chikalovets I., Molchanova V., Hua K.-F. Lectin CGL from the sea mussel *Crenomytilus grayanus* induces Burkitt's lymphoma cells death via interaction with surface glycan. *Int. J. Biol. Macromol.* 2017;104:508–514.