

СОФИЙСКИ УНИВЕРСИТЕТ “СВ. КЛИМЕНТ ОХРИДСКИ”
БИОЛОГИЧЕСКИ ФАКУЛТЕТ
КАТЕДРА “БИОХИМИЯ”



**Изследване на взаимодействията на биологично активни агенти с
мембранни домени и тяхната роля в еукариотни клетки**

АВТОРЕФЕРАТ

на дисертационен труд

за присъждане на образователна и научна степен “Доктор” по професионално
направление 4.3 Биологически науки (Молекулярна биология)

Докторант:
Юлия Георгиева Пецева

Научни ръководители:
Проф. д-р Светла Петрова
Проф. дбн Йордан Думанов

София, 2025г.

Благодарности:

Изказвам благодарност на моите научни ръководители проф. д-р Светла Петрова и проф. д-р Йордан Думанов за техния професионализъм и ценни напътствия при оформянето и реализацията на този дисертационен труд. Благодаря на доц. д-р. Кирилка Младенова и на всички колеги от екипа за техните полезни съвети и съпричастност към експерименталните дейности. Настоящата дисертация е разработена с финансовата подкрепа на МОН, по договор "Научна Инфраструктура Клетъчни Технологии в Биомедицината от НПКНИ" DOI-178/2022 и Фонд „Научни изследвания” при МОН по договор КП-06-Н83/7 от 05.12.2024г.

Списък на използваните съкращения:

AA	-	арахидонова киселина	SDS	-	натриев додецилсулфат
BC	-	бета-катенин	<i>sn</i>	-	стереохимично номериране
BCA	-	бицинхонинова киселина	sPLA₂	-	секреторна фосфолипаза A ₂
BSA	-	телешки серумен албумин	TEER	-	Трансепителна електрическа резистентност
Ca²⁺	-	калций	TEMED	-	тетраметилендиамин
DMSO	-	диметил сулфоксид	Tris	-	2-амино-2-хидроксиметил-пропан-1,3-диол
DAG	-	диацил глицероли	VAC	-	кисел компонент на випоксина
DHA	-	докозохексанова киселина	VBC-sPLA₂	-	основен компонент на випоксина
EPA	-	ейкозопентанова киселина	CMK	-	свободни мастни киселини
FPLC	-	ускорена течна хроматография на протеини			
GII PLA₂	-	фосфолипаза A ₂ от група 2			
GIIA D49 PLA₂	-	фосфолипаза A ₂ от група 2 с аспарат (Asp) на 49 място			
LPLA₂	-	лизозомна фосфолипаза A ₂			
NBS	-	N-бромосукцинимид			
ncHdPLA₂s		нековалентно свързана PLA ₂			
NOBA	-	4-нитро-3-(октаноилокси)бензоена киселина			
PA	-	фосфатидна киселина			
PAGE	-	полиакриламидна гел електрофореза			
pBPB	-	пара-бромовенацилбромид			
pI	-	изоелектрична точка			
PLA₂	-	фосфолипаза A ₂			
RPE		ретиален пигментен епител			

1. Увод

Змийските отрови представляват многокомпонентни токсикологични смеси от биологично активни субстанции, чието синергично действие цели да предизвика общи и локални увреждания в организма на жертвата. В химичния състав на тези сложни комплекси присъстват предимно белтъчни молекули и полипептиди с разнообразни биологични и фармакологични свойства, както и множество небелтъчни компоненти като липиди, нуклеинови киселини, въглехидрати и неорганични съединения. Значителна част от широкоспектърните токсични прояви при отравяне са резултат от действието на ензимно активни молекули като L-аминокиселинни оксидази, металопротеази, фосфолипази, протеази и др. Тяхната функционална активност може да повлияе различни физиологични системи предизвиквайки сложна палитра от патофизиологични ефекти като невротоксичност, миотоксичност, кардиотоксичност, цитотоксичност, нарушение на хемостазата, възпаление, хипотензия, некроза (Kang, et al. 2011). Въпреки токсичния си характер, компонентите на змийските отрови притежават специфични структурни и функционални характеристики, които ги превръщат във важен научен инструмент за изучаването на редица жизнени процеси и определят възможност за приложението им като прототипи на терапевтични средства (Robinson et al. 2017).

Българската пепелянка *Vipera ammodytes meridionalis* е силно отровен вид, населяващ предимно източноевропейските региони на Гърция, Турция и България. Ухапванията се асоциират с наличието на множество изяви като локално увреждане на тъканите, болка, кървене, треска, парализа, тахикардия и други (Frangides et al. 2006). Основен фактор в токсикологичното действие на отровата е присъствието на невротоксина випоксин, изолиран за първи път и пречистен през 70-те години на миналия век от Шиполини и Алексиев (Shipolini et al., 1970). Той представлява хетеродимерен комплекс съставен от две белтъчни субединици с висока степен на структурна идентичност и различни функционални особености. Едната субединица е силно токсична и се отнася към групата на секреторните фосфолипази A₂ (VBC-sPLA₂), а другата е ензимно неактивен и нетоксичен компонент (VAC), чиято роля в комплекса все още не е напълно изяснена.

Изследването на специфичното взаимодействие на випоксина и неговите мономери с клетъчни моделни системи би подпомогнало по-доброто разбиране на молекулните механизми на патологичните процеси, предизвиквани от секреторните фосфолипази на клетъчно ниво, както и дефиниране на ролята на индивидуалните субединици за манифестиране на различните фармакологични ефекти и степента на токсичност на комплекса. Детайлното проучване на структурно-функционалните зависимости на токсина са основна предпоставка за установяване на потенциални възможности за приложението му в биомедицината.

В настоящия дисертационен труд беше направен сравнителен анализ на влиянието на хетеродимерния комплекс випоксин и неговите дисоциирани мономерни субединици VBC-sPLA₂ и VAC върху две клетъчни линии от ретинален пигментен епител – RPE-1 и APRE-19. Беше проследено въздействието на комплекса и компонентите му върху различни аспекти от клетъчната физиология като преживяемост, промени в мембранныя интегритет, реорганизацията на цитоскелета, индукция на генотоксичност и сигнализационни събития.

2. Цел и задачи:

Да се изследват взаимодействията на биологично активни агенти (хетеродимерен невротоксин випоксин, изолиран от подвида *Vipera ammodytes meridionalis*, и неговите индивидуални мономерни субединици с мембранны домени и еукариотни клетки.

За изпълнението на поставената цел, бяха поставени следните задачи:

1. Да се определи цитотоксичността на хетеродимерния випоксин и мономерните VBC-sPLA₂ и VAC чрез изследване на влиянието им върху метаболитната активност на RPE-1 и ARPE-19 клетки.
2. Да се изследва интегритета на плазмената мембрана на двете клетъчни линии при въздействие с випоксин и мономерите му.
3. Да се проследят промените в трансепителната резистентност на монослоевете от RPE-1 и ARPE-19 клетки при въздействие с випоксин, VBC-sPLA₂ и VAC.
4. Да се установи експресията на PLA₂R1 рецептор в ретиналните пигментни клетки от двете линии.
5. Да се изследва реорганизацията на актиновия цитоскелет и β-катенина в ретиналните пигментни клетки под влиянието на випоксин, VBC-sPLA₂ и VAC.
6. Да се определи способността на випоксин, VBC-sPLA₂ и VAC да инициират клетъчно-сигнализационни събития в ретинални пигментни клетки.
7. Да се направи оценка на генотоксичността на випоксин, VBC-sPLA₂ и VAC върху двете изследвани клетъчни линии.
8. Да се изследват механизмите, отговорни за токсичното действие на випоксин, VBC-sPLA₂ и VAC върху RPE-1 и ARPE-19 клетки – апоптоза/некроза.

3. Материали и методи

3.1 Клетъчно култивиране

3.2 Биохимични методи за определяне свойства на sPLA₂

3.2.1 Изолитране и пречистване на хетеродимерния невротоксин випоксин и дисоциация на субединиците му

3.2.2 Проверка на хомогенността на изолитраната sPLA₂ чрез SDS-PAGE

3.2.3 Измерване на количество белтък

3.2.4 Спектрофотометрично определяне на фосфолипазна активност

3.3 МТТ колориметричен тест за определяне на метаболитна активност

3.4 Оцветяване на RPE-1 и ARPE-19 клетки с трипаново синьо след третиране с VBC-sPLA₂, VAC и випоксин

3.5 Измерване на трансепителната резистентност на монослоевете от RPE-1 и ARPE-19 след третиране със VBC-sPLA₂, VAC и випоксин

3.6 Флуоресцентно визуализиране на актиновия цитоскелет и имунодетекция на β -катенин

3.7 Тънкослойна хроматография на липиди

3.8 Имунодетекция на PLA₂R1 – M - рецептор за sPLA₂ в мембраните на RPE-1 и ARPE-19 клетки

3.8.1 Приготвяне на клетъчни лизати

3.8.2 Полиакриламидна гел електрофореза (SDS-PAGE) и имунодетекция (Western blot)

3.9 Имунодетекция на p38 MAPK и phospho-p38MAPK в RPE-1 клетки

3.9.1 Третиране на клетките и приготвяне на клетъчни лизати

3.9.2 Определяне количество белтък

3.9.3 Полиакриламидна гел електрофореза (SDS-PAGE) и имунодетекция (Western blot)

3.10 Коментен анализ в неутрални условия.

3.11 Детекция на апоптоза

4. Резултати и дискусия

4.1 Определяне на цитотоксичността на випоксин и самостоятелните му субединици – VBC-sPLA₂ и VAC, чрез изследване влиянието им върху метаболитната активност на клетките.

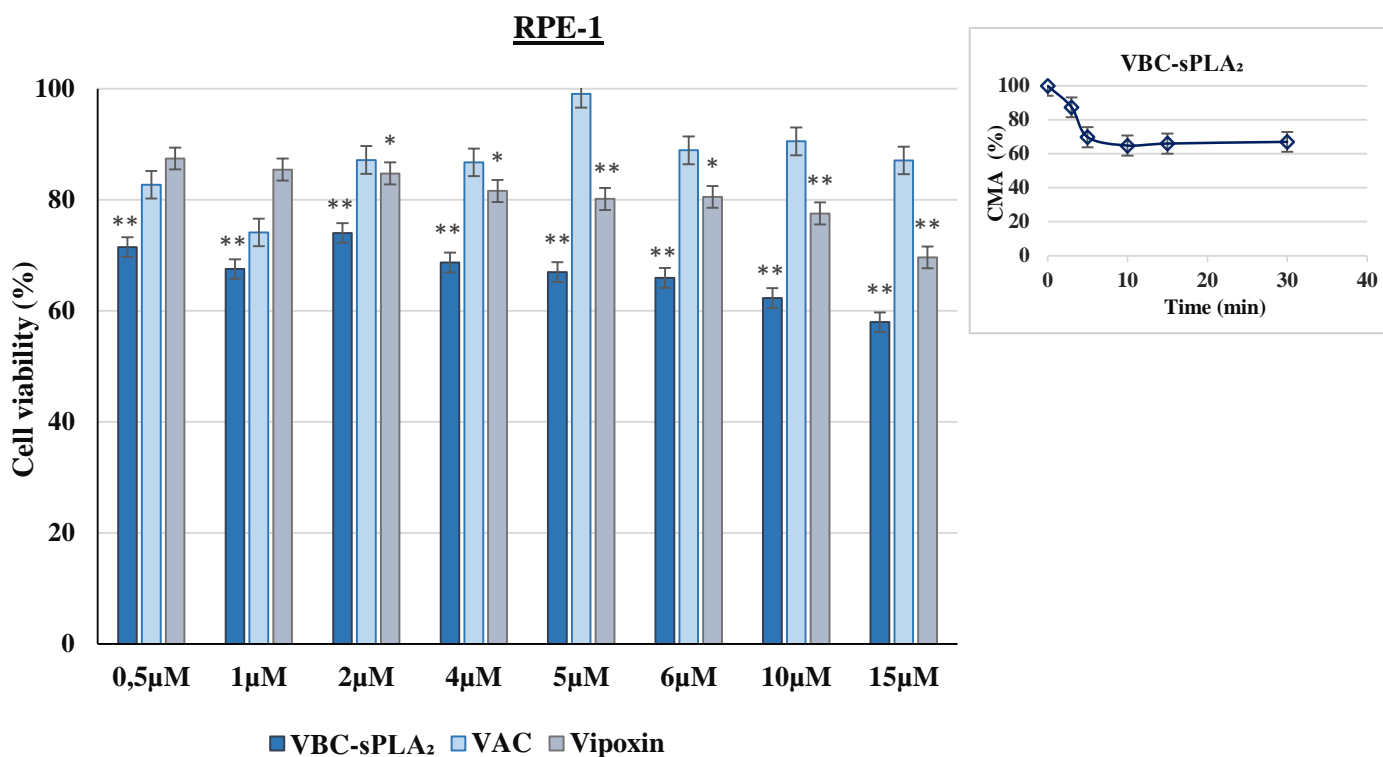
Едни от най-силно проявените въздействия, съпътстващи ухапванията от представителите на семейство Отровници (*Viperidae*), се характеризират с локални и общи токсични увреждания (Doumanov et al., 2014). С оглед на това, първоначалната задача бе да се установи цитотоксичното влияние на випоксина, основен компонент на отровата изолирана от *Vipera ammodytes meridionalis*, както и на неговите дисоциирани субединици VBC-sPLA₂ и VAC върху избраните RPE клетъчни линии. За тази цел беше използван МТТ колориметричен тест за определяне на метаболитна активност.

Изследванията бяха проведени при третиране на клетките от двете клетъчни линии RPE-1 и ARPE-19 с нарастващи концентрации (0,5 - 15µM) на индивидуалната ензимна VBC-sPLA₂ субединица, VAC и випоксин в продължение на 1 час. Стойностите на метаболитна активност, получени след инкубация на ретиналните пигментни клетки от линиите RPE-1 и ARPE-19 с випоксин, VBC-sPLA₂ и VAC са представени графично на фигура 2 (А и Б).

От графикаките, представени на фигура 2 А и Б се вижда, че ензимната субединица на комплекса VBC-sPLA₂ повлиява преживяемостта на клетките от линиите RPE-1 и ARPE-19. Отчетените стойности при използваните ензимни концентрации показват индуциране на линеен спад в метаболитната активност на третираните клетки, в сравнение с нетретираните, които са използвани като контрола. VBC-sPLA₂ предизвиква концентрационно-зависимо понижаване на метаболитната активност на изследваните ретинални клетки, по-силно изразено при линията RPE-1. Въздействието на най-високата ензимна концентрация (15µM) върху клетките от тази линия предизвиква спад в преживяемостта, чиито стойности приближават цитотоксичната доза (редукция на клетъчната жизнеспособност с над 40%).

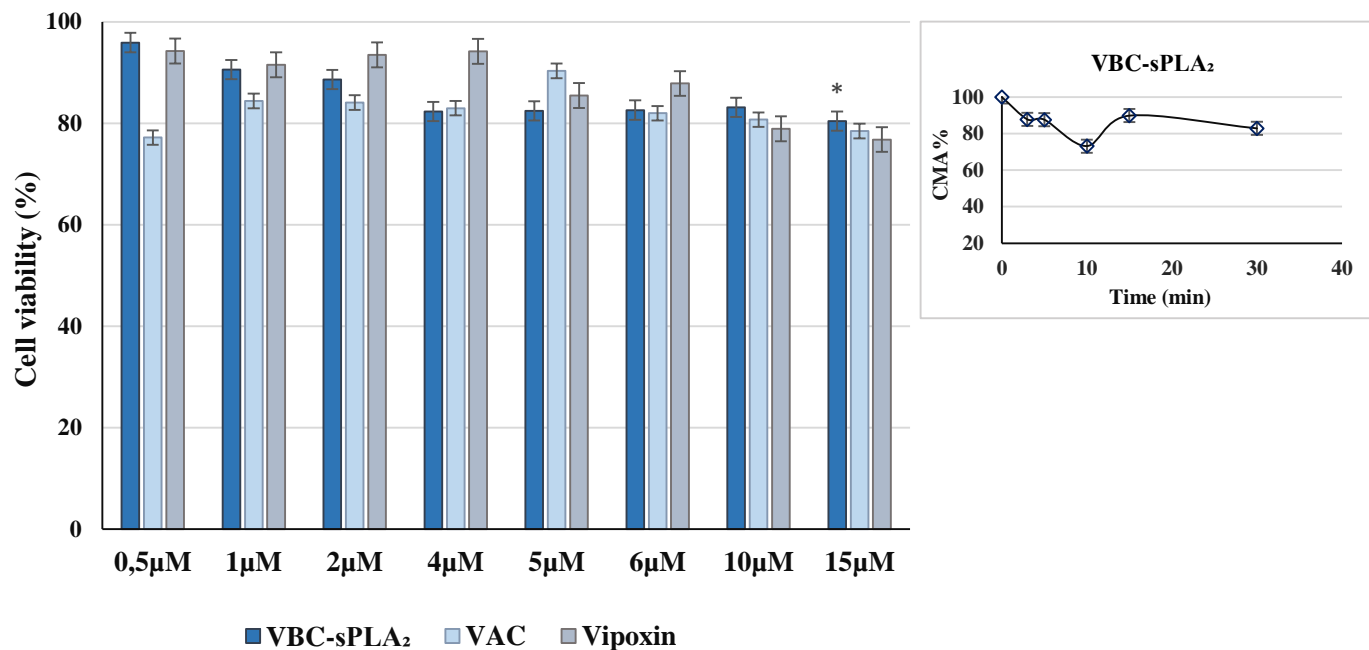
Сравнителният анализ на въздействието на VBC-sPLA₂ върху двете клетъчни линии показва съществена разлика в отговора на RPE-1 и ARPE-19 клетките спрямо ензимното действие. Клетъчната преживяемост, изчислена като процент от преживяемостта на нетретираните клетки, е по-висока при клетките от линията ARPE-19 (~80%) в сравнение с

тази на RPE-1 линията (~58%) при въздействие с най-високата концентрация. Жизнеспособността на ARPE-19 клетките не се повлиява при въздействие с ниските ензимни концентрации (0,5 μM и 1 μM), като стойностите остават близки до тези на контролните клетки, докато при линията RPE-1 се забелязва спад с над 20% още след третиране с най-ниската концентрация от 0,5 μM . Нарастването на ензимните концентрации води до допълнително понижаване в стойностите на метаболитната активност само при RPE-1 клетките, докато при ARPE-19 клетките въздействие с VBC-sPLA₂ от 4 до 15 μM не предизвиква промяна в метаболитната активност.



Фигура 2 А. Метаболитна активност на клетки от линията RPE-1 (2.5×10^4), третирани в продължение на 1 час с VBC-sPLA₂, VAC и випоксин в различни концентрации. Стойностите са изчислени като процент спрямо тези на контролните клетки (100%). Представени са осреднени данни от повече от три независими експеримента (\pm SEM). Статистически значими различия: ** $p < 0.01$, * $p < 0.05$ в сравнение с нетретираните клетки (one-way ANOVA последван от Dunnett's test). В инсета е представена метаболитната активност на RPE-1 клетки (2.5×10^4), третирани с индивидуална VBC-sPLA₂ субединица в концентрация 5 μM за 3, 5, 10, 15, 30 и 60 мин, изразена в проценти спрямо контролата.

ARPE-19



Фигура 2 Б. Метаболитна активност на клетки от линията ARPE-19 (2.5×10^4), третираны в продължение на 1 час с VBC-sPLA₂, VAC и випоксин в различни концентрации. Стойностите са изчислени като процент спрямо тези на контролните клетки (100%). Представени са осреднени данни от повече от три независими експеримента (\pm SEM). Статистически значими различия: * $p < 0.05$ в сравнение с нетретираните клетки (one-way ANOVA последван от Dunnett's test). В инсета е представена метаболитната активност на RPE-1 клетки (2.5×10^4), третираны с индивидуална VBC-sPLA₂ субединица в концентрация 5 μM за 3, 5, 10, 15, 30 и 60 мин, изразена в проценти спрямо контролата.

Тези резултати отразяват различията в състава на клетъчните мембрани (фосфолипиден и белтъчен), по-висок афинитет и по-висока специфичност на ензима към анионни липиди (присъстващи в по-висока концентрация във външния слой на мембраните на RPE-1 клетките (фиг. 5), по-голям достъп на ензима до дезорганизираны мембранни участъци („дефекти в мембраната“), морфологията, поляризацията и метаболитната активност на двете клетъчни линии (Petan et al., 2005).

При въздействие на RPE клетките с идентичны концентрации на ензимно неактивната субединица VAC не се установяват особены разлики в клетъчната преживяемост и при двете клетъчни линии в сравнение с нетретираните клетки (Фиг. 2 А и Б). Въпреки това се забелязва понижение в стойностите на метаболитната активност до около 74% (за RPE 1) и 77% (ARPE19), което доказва наличието на некаталитичен механизъм, чрез който нетоксичният компонент на випоксина оказва влияние върху

жизнеспособността на клетките. Известно е, че секреторните фосфолипази са способни да въздействат върху клетките по неензимен механизъм, чрез взаимодействие със специфични мембранни белтъчни компоненти и рецептори (Kini and Evans, 1989). Твърде вероятно е, за VAC да съществува подобен механизъм, който би могъл да включва свързване със специфичен рецептор и интернализация на VAC-рецептор комплекса в клетките. От получените графики се вижда, че промените, които възникват в резултат от третирането на клетките с некаталитичния VAC нямат концентрационно-зависим характер за разлика от резултатите получени при въздействие с VBC-sPLA₂. Също така, не се установява тенденционна разлика в отговора на клетките от двете клетъчни линии спрямо действието на VAC, като стойностите на метаболитна активност остават близки, а при някои концентрации те са идентични.

Въздействието на хетеродимерния комплекс випоксин (в еквивалентни концентрации) върху двете клетъчни линии от ретинален пигментен епител предизвиква дозово-зависими промени в метаболитната активност на клетките, които отново са по-силно застъпени при линията RPE-1 (Фиг. 2 А и Б). Според стойностите, показани на графиките най-изразено влияние върху преживяемостта на RPE-1 клетките оказва най-високата концентрация випоксин (15 μ M), която предизвиква спад в клетъчната жизнеспособност с близо 30% в сравнение с нетретираните клетки. При клетките от линията ARPE-19 най-високата випоксинова концентрация води до понижение в стойностите на метаболитна активност с \sim 23 % (Фиг. 2 Б). Подобно на мономерната VBC-sPLA₂, хетеродимерният комплекс проявява по-висок афинитет към мембраните на RPE-1 клетките, което потвърждава каталитичната роля на фосфолипазната активност на комплекса. Данните от графиката показват, че цитотоксичното влияние на випоксина е по-слабо изразено в сравнение с резултатите получени за неговата самостоятелна каталитична субединица. Тези наблюдения кореспондират с данните получените при подобни изследвания, проведени върху хепатоцити (Doumanov et al., 2015), според които хетеродимерният випоксин не повлиява жизнеспособността на HepG2 клетките за разлика от мономерната VBC-sPLA₂, която предизвиква редуция на метаболитната активност с 49%.

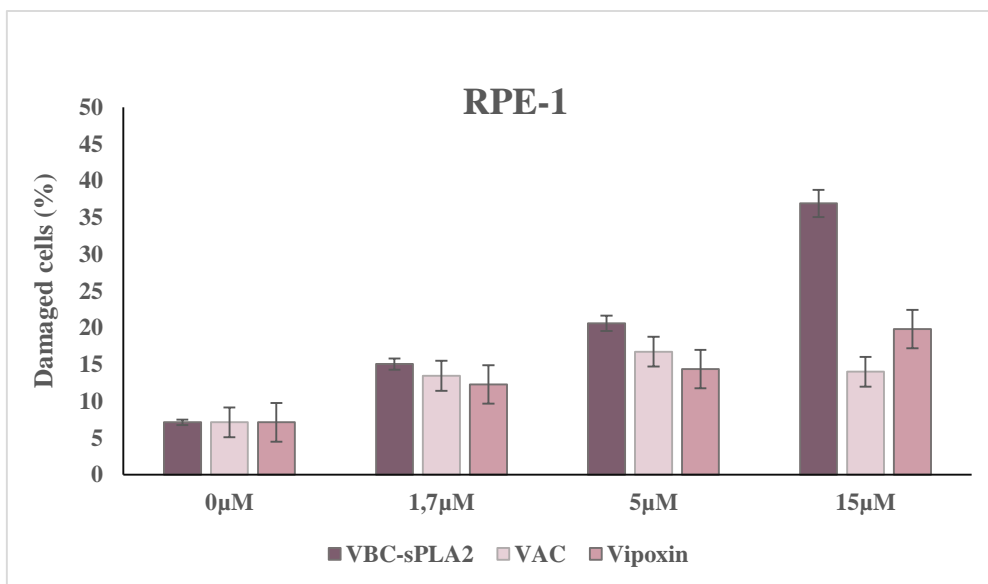
Кинетиката на ензимното действие на каталитичната субединица VBC върху мембраните на RPE клетките бе анализирана, като за целта беше избрана междинна

концентрация на фосфолипазата ($5\mu\text{M}$) и времеви диапазон от 60 мин, а данните за метаболитна активност на клетките бяха отчитани през кратки интервали. Резултатите от експеримента са показани на Фигура 2 А и Б (инсети).

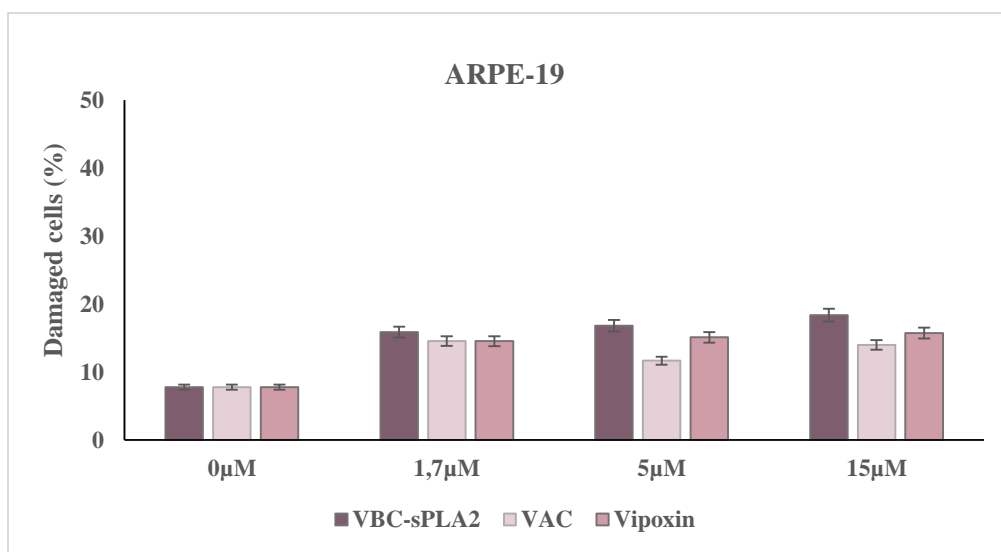
Графиката на фигура 2 А показва класически ход на кинтичната крива на разграждане на субстрата - мембраните на клетките от линията RPE-1 от VBC-sPLA₂ (начална скорост v_0). След позициониране на ензима върху клетъчната мембрана и инициране на повърхностното активиране на ензима (3-та мин), преживяемостта на клетките спада под 70% до 10-та мин, след което скоростта на ензимната реакция намалява и се запазва до 60-тата минута, когато се отчитат 62% преживели клетки. При клетките от линията ARPE-19, определената начална скорост на ензимната реакция е по-ниска и на 10-та мин е отчетена преживяемост от ~74% (Фиг. 2 Б). Тези стойности корелират с получените от предходния МТТ тест. Намалението на скоростта на реакцията след 10-та минута е свързано с интернализацията на ензима в клетките, възстановяване на мембраните, реорганизацията на цитоскелета и всички клетъчни събития, които имат за цел запазване на целостта и жизнеността на клетките.

4.2 Изследване влиянието на VBC-PLA₂, VAC и випоксин върху интегритета на плазмената мембрана на RPE-1 и ARPE-19 клетки

За изследване на цитотоксичния ефект на випоксин и компонентите му върху RPE клетките и проследяване на степента на увреждане на клетъчните мембрани, беше направено оцветяване с виталното багрило трипаново синьо. Този метод позволява да се отдиференцират живите от мъртви клетки, поради интернализацията на багрилото само в клетки, чиято мембрана е била компрометирана. За да се направи съпоставка с данните от МТТ теста бяха използвани нарастващи концентрации (1.7, 5 и 15 μM) на VBC-PLA₂, VAC и випоксин, с които клетките от двете клетъчни линии бяха третирани в продължение на 1 час. Резултатите от виталното оцветяване показаха, че випоксин и мономерните му субединици повлияват в различна степен мембраните ретиналните пигментни клетки (фигура 3 и 4).

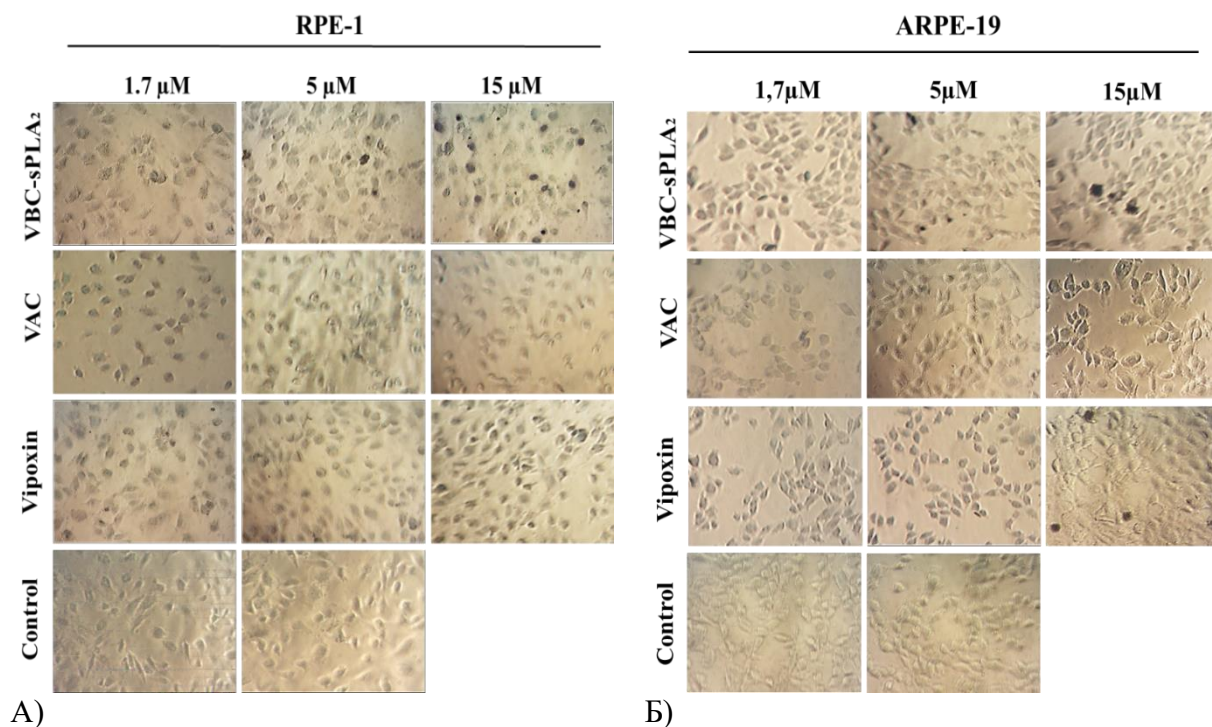


Фигура 3 А. RPE-1 клетки ($2,5 \times 10^4$), третираны с различни концентрации VBC-PLA₂, VAC и випоксин за 1 час и оцветени с багрилото трипаново синьо.



Фигура 3 Б. ARPE-19 клетки ($2,5 \times 10^4$), третираны с различни концентрации VBC-PLA₂, VAC и випоксин за 1 час и оцветени с багрилото трипаново синьо.

Микроскопски изображения на клетките са представени на фигури 4 А и Б.



Фигура 4. Микроскопски изображения на RPE-1 (А) и ARPE-19 (Б) клетки, третирани с различни концентрации VBC-PLA₂, VAC и випоксин за 1 час и оцветени с багрилото трипаново синьо.

От графиката, представена на фигура 3 А се вижда, че при линията RPE-1 най-голям брой клетки с увредена мембрана се установяват след третиране с най-високата концентрация на индивидуалната VBC-PLA₂ субединица. Изчислените стойности корелират напълно с данните, получени при прилагане на теста за измерване на метаболитната активност (MTT) и показват концентрационно-зависимо влияние на каталитичния компонент VBC върху клетъчните мембрани. Най-ниската концентрация (1,7 μ M VBC-PLA₂) води до увреждане на около 18% от клетките, докато при въздействие с 15 μ M VBC-PLA₂, делът на клетките с трайно увредени мембрани достига 41%. Резултатите от виталното оцветяване показват, че фосфолипазата индуцира трайни увреждания в мембраните на клетките, което се дължи на натрупване на продуктите на ензимната реакция – лизофосфолипидите, които предизвикват промени в организацията на мембраните, образуване на мицели и силно нарушаване интегритета на плазмената мембрана.

При въздействие върху ARPE-19 клетки с идентични концентрации на VBC-sPLA₂, се детектира значително по-малък процент увредени клетки в сравнение с тези при RPE-1 линията. При инкубация с най-ниската концентрация на ензимната субединица VBC-PLA₂ (1,7 μM) се установяват около 15% клетки с увредена мембрана, а при 15 μM VBC-PLA₂ броят им достига 22% .

Хетеродимерният невротоксин випоксин предизвиква нарушения в целостта на мембраната на клетките от ретинален пигментен епител в значително по-малка степен (Фиг. 3 А и Б). При линията RPE-1 броят на увредените клетки се променя от около 13% при използване на 1,7 μM випоксин до 27% след въздействие с най-високата концентрация. По-нисък процент на увредени клетки се установяват при линията ARPE-19, при които стойностите се променят от 12% до 15%. По-ниските стойности определени за действието на хетеродимерния випоксин в сравнение с тези на самостоятелната VBC-sPLA₂ потвърждават ролята на ензимната субединица и инхибирането ѝ при образуване на комплекса.

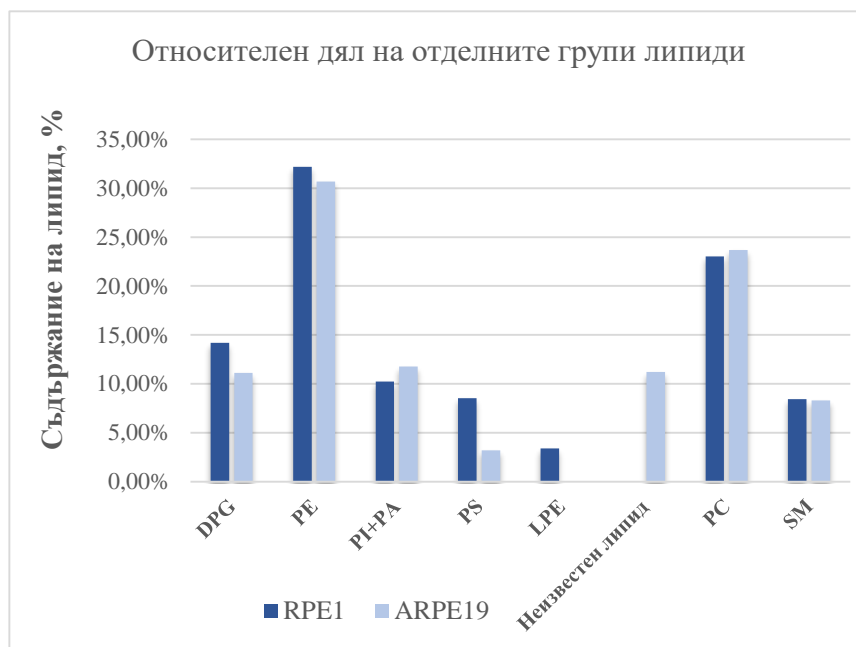
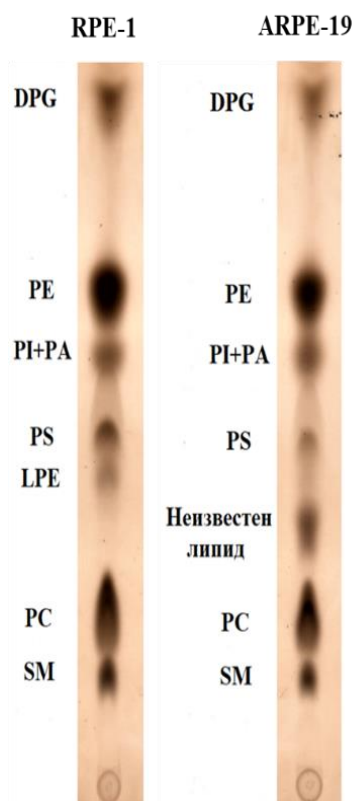
Некаталитичният компонент VAC оказва слабо влияние върху мембрания интегритет на ретиналните пигментни клетки. И при двете клетъчни линии не се установява концентрационно-зависимо действие в резултат от инкубацията на клетките с нарастващи концентрации на нетоксичния компонент. При линията RPE-1 най-висок процент увредени клетки (близо 17%), се установява при въздействие с междинната концентрация (5 μM VAC), а при ARPE-19 стойностите остават близки и не надвишават 14%. Фактът, че въздействието на VAC е еднакво при двете клетъчни линии, показва единен молекулен механизъм, независим от структурните разлики на мембраните на RPE-1 и ARPE-19 клетките.

4.3 Качествено и количествено определяне на липидни фракции от плазмени мембрани на RPE-1 и ARPE-19 клетки

Поради съществените разлики, които бяха установени в отговора на двете клетъчни линии спрямо въздействието с комплекса випоксин и неговата отделна каталитична субединица VBC-sPLA₂, беше логично да насочим вниманието си към основната прицелна мишена на тяхното действие, а именно мембранните фосфолипиди. За да установим потенциално съществуващи различия в състава на плазмените мембрани на RPE-1 и ARPE-19 клетките, липидни фракции от двете клетъчни линии бяха подложени на

количествен и качествен анализ чрез тънкослойна хроматография. Резултатите от липидния анализ на двете клетъчни култури са показани на фигура 5 А и Б.

Резултатите от тънкослойната хроматография показват количествени и качествени различия в състава на основните липиди, изграждащи мембраните на двете линии. Най-съществена разлика се забелязва в количеството на фосфатидилсерина, чието присъствие в мембраните на RPE-1 клетките е с около 5 % по-високо, отколкото в тези на линията ARPE -19 (Фиг. 5). Това е от значение за каталитичното действие на фосфолипазата, тъй като е добре известно, че sPLA₂ проявяват висок афинитет към хидрофилните глави на анионни липиди като фосфатидилсерина (Kini, 1997; Berg et al., 2001; Dennis et al., 2011). Липидният състав на мембраните на клетките от линията RPE-1 показва по-високо съдържание (с около 2%) и на един от другите специфични субстрати за секреторните фосфолипази – фосфатидилетиноламин. Забелязват се и различия в качествения състав, който показва наличие на лизофосфатидилетиноламин само в мембраните на ретиналните клетки от линията RPE-1. Присъствието на друг, неизвестен липид, се открива само при ARPE -19 клетъчната линия.



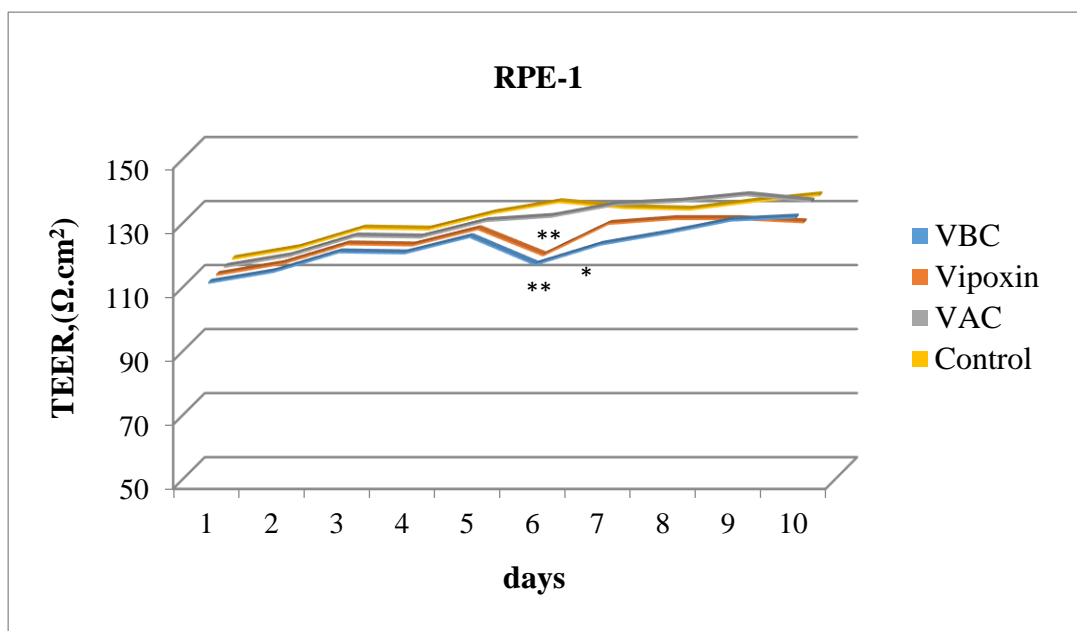
Липид	RPE-1	ARPE-19
DPG	14.20%	11.12%
PE	32.18%	30.66%
PI+PA	10.24%	11.77%
PS	8.54%	3.20%
LPE	3.38%	0.00%
Неизвестен липид	0.00%	11.23%
PC	23.02%	23.69%
SM	8.45%	8.32%

Фигура 5 А. Тънкослойна хроматография на мембранни липиди, изолирани от линиите RPE-1 и ARPE-19. Съкращения: DPG – кардиолипин, PE – фосфатидилетаноламин; PI – фосфатидилинозитол; PA – фосфатидна киселина; PS – фосфатидилсерин; LPE – лизофосфатидилетаноламин; PC – фосфатидилхолин; SM – сфингомиелин. Б) Количество липид в проценти, определено според площта и интензитета на съответното петно върху хроматографската плака.

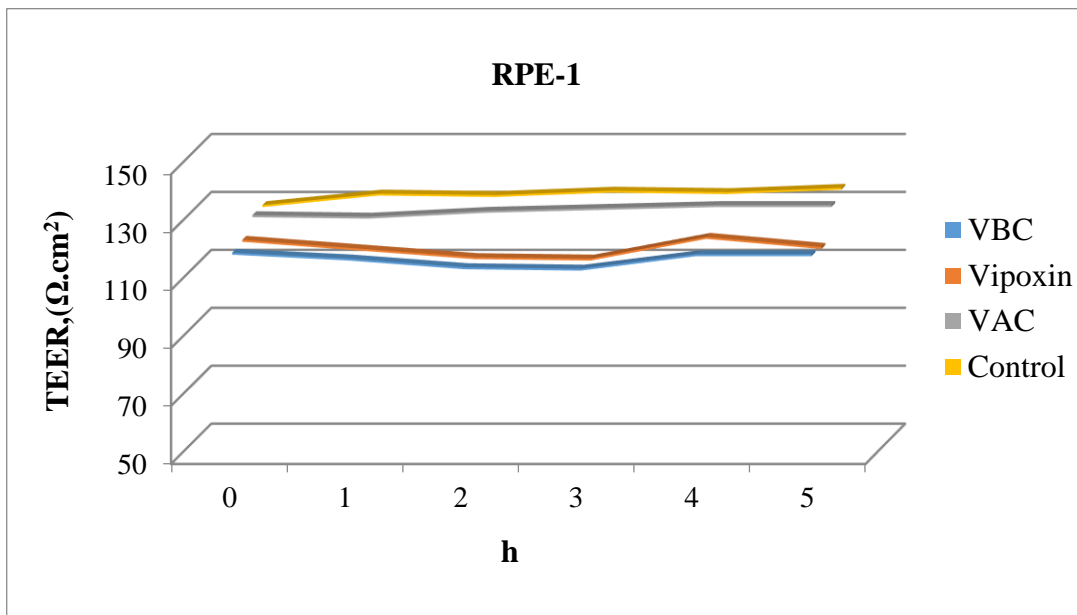
4.4 Сравнителен анализ на влиянието на VBC-sPLA₂, VAC и випоксин върху мембрания интегритет на клетки от ретинален пигментен епител чрез измерване на трансепителната електрическа резистентност (TEEP).

Измерването на трансепителната електрическа резистентност (TEEP) е широко разпространен подход за количествено определяне на интегритета на мембраната и динамиката на плътните контакти в монослойни клетъчни култури. Методът изисква

клетките да бъдат отглеждани върху порест филтър, при което контактът с хранителната среда се осъществява както от апикалната, така и от базолатералната мембрана. По този начин култивационните условия имитират в по-голяма степен естествената среда в морфологично и функционално отношение. При измерване на йонната проводимост основното съпротивление се получава от клетъчните мембрани и междуклетъчните контакти. Стойностите на TEER отразяват в значителна степен физическите свойства и бариерните функции на клетъчния монослой и са силен индикатор за оценка на плътните контакти и пропускливостта на мембраната. Това наложи да бъде проследено влиянието на комплекса випоксин и неговите мономерни субединици върху пермеабелитета на клетъчния монослой като RPE-1 и ARPE-19 клетки бяха култивирани върху поликарбонатна мембрана в продължение на 10 последователни дни, а стойностите на TEER бяха отчитани на 24 часови интервали. На шестия ден от растежа клетките бяха инкубирани с випоксин, VBC-sPLA₂ и VAC в концентрация 1,7μM за 2.5 x 10⁵ кл. в продължение на 1 час. Резултатите от експеримента са представени графично на фигура 6 (А и Б) и 7 (А и Б).



Фигура 6 А. Трансепителна резистентност на RPE-1 клетки, измерена в продължение на 10 дни. На шестия ден от растежа клетките са третирани с VBC-sPLA₂, випоксин и VAC (1,7μM / 2.5 x 10⁵ кл.) за 1 час. Статистически значими различия: **p<0.01, * p<0.05 в сравнение с нетретираните клетки (one-way ANOVA последван от Dunnett's test).



Фигура 6 Б. Трансепителна резистентност на RPE-1 клетки на шести ден от растежа, измервана на всеки 30 мин в продължение на 5 часа след изтичане на инкубацията с VBC-*sPLA*₂, випоксин и VAC (1,7μM / 2.5 X 10⁵ кл.).

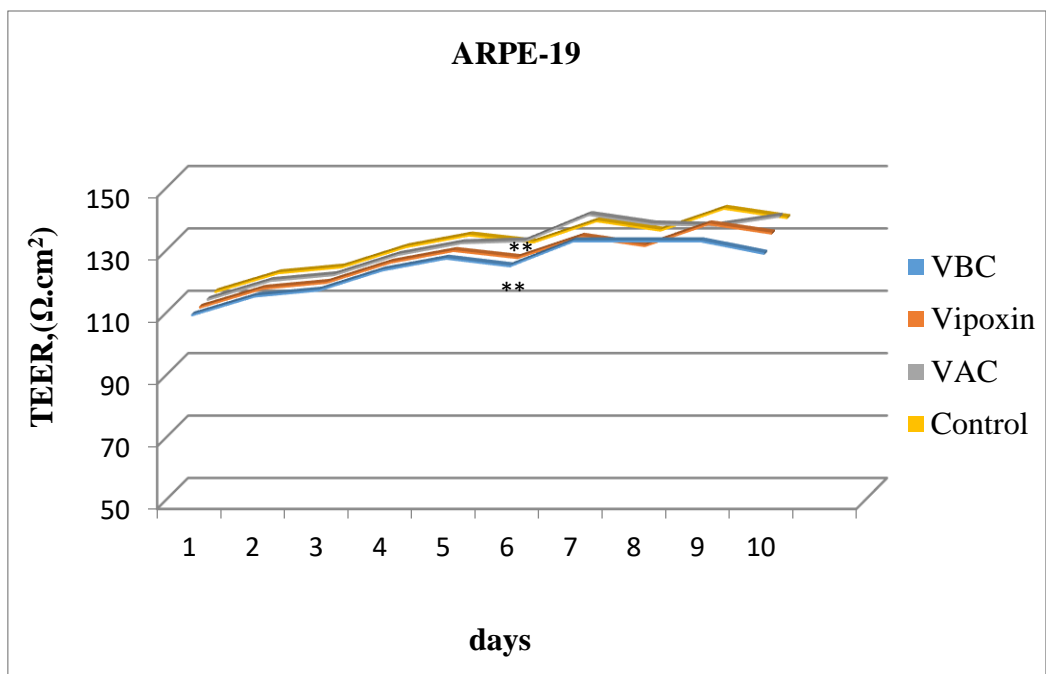
При ретиналните епителни клетки от линията RPE-1 стойностите на TEER се повишават постепенно, което предполага формирането на плътен клетъчен монослой, обусловен от междуклетъчните контакти (фигура 6 А). От графиката се вижда, че на шестия ден от развитието на културата, в следствие на третирането на клетките с хетеродимерния комплекс или с индивидуалната VBC-*PLA*₂, се наблюдава редуция в трансепителната резистентност, което корелира с повишен трансеклетъчен пермеабилитет. Въздействието на фосфолипазите A₂ – димерен випоксин и мономерна VBC - върху RPE-1 клетки, предизвиква почти еднакво понижение на клетъчния пермеабилитет, като отчетените стойности на TEER са с около 15 Ω по-ниски от тези на контролните клетки. При третирането на клетките с каталитично неактивната субединица VAC, подобни промени не се детектират и стойностите на TEER остават близки до тези на нетретираните клетки. Следователно неензимната субединица на випоксина не повлиява плътността на клетъчния монослой, което отново налага схващането за участие на каталитичен механизъм при измененията в йонната проводимост на RPE-1 клетките.

През следващите дни третираните клетки постепенно повишават стойностите на TEER приближавайки тези на контролните клетки (Фиг. 6 А). Това отразява стремежа на

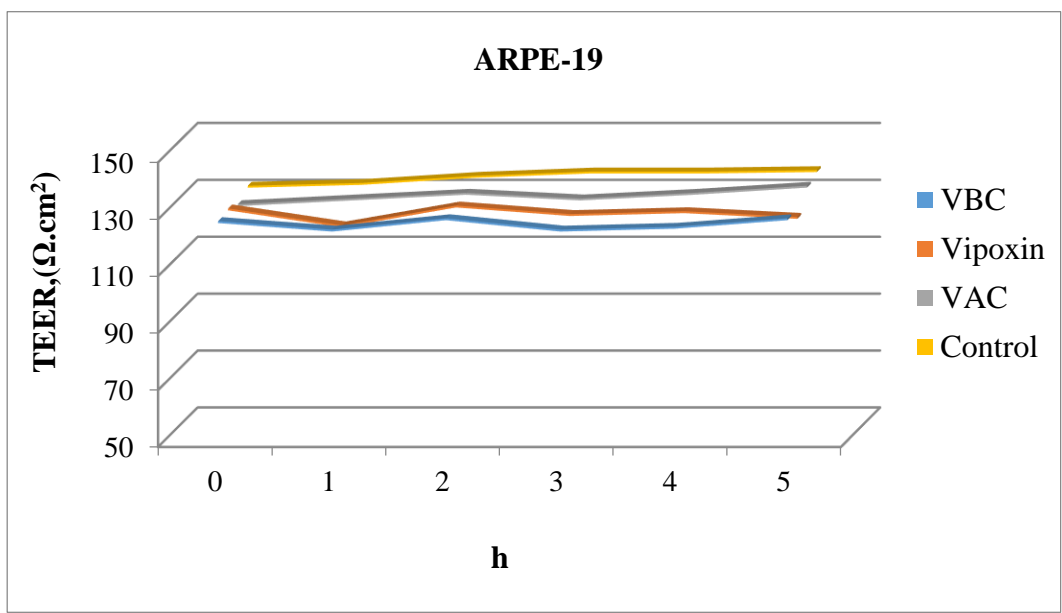
клетките към възстановяване на бариерните свойства и целостта на клетъчния монослой. Нарастването в стойностите на трансепителната резистентност може да се дължи на факта, че предизвиканите от влиянието на випоксин и VBC-PLA₂ промени не са трайни, а временни и обратими, и клетките успяват да възстановяват целостта си чрез задействане на специфични компенсаторни механизми.

С цел да се проследят кратковременните ефекти от действието на випоксина и неговите компоненти върху плътността на монослоя, данните за ТЕЕР бяха измервани през равни интервали в продължение на 5 часа след изтичане на инкубацията (Фиг. 6 Б). От графиката се вижда, че действието на самостоятелната субединица VBC-sPLA₂ и хетеродимерният випоксин предизвикват редукция в интегритета на мембраната на клетките от линията RPE-1 непосредствено след края на инкубацията, като стойностите продължават да се понижават през останалите интервали на измерване, достигайки най-ниски нива на втория и третия час, след което започват да се повишават. Постепенното понижение на трансепителната клетъчна резистентност в първите часове след третирането и достигането на най-ниските нива на третия час, би могло да се обясни с акумулирането на продуктите на ензимната реакция, чието действие е свързано с нарушаване на междуклетъчните контакти и мембрания интегритет.

При клетъчната линия ARPE-19 инкубацията на клетките със същата концентрация на VBC-sPLA₂, VAC и випоксин предизвиква сходни промени, но доста по-слабо изразени в сравнение с тези при RPE-1 клетките (Фиг. 7 А).



Фигура 7 А. Трансепителна резистентност на ARPE-19 клетки, измерена в продължение на 10 дни. На шестия ден от растежа клетките са третирани с VBC-sPLA₂, випоксин и VAC (1,7μM / 2.5 x 10⁵ кл.) за 1 час. Статистически значими различия: **p<0.01 в сравнение с нетретираните клетки (one-way ANOVA последван от Dunnett's test).



Фигура 7 Б. Трансепителна резистентност на ARPE-19 клетки на шести ден от растежа, измервана на всеки 30 мин в продължение на 5 часа след изтичане на инкубацията с VBC-sPLA₂, випоксин и VAC (1,7μM / 2.5 X 10⁵ кл.).

Анализът на стойностите от получената графика показва спад в стойностите на ТЕЕР само с около 5-6 Ω при клетките, третирани с випоксин и пречистения VBC ензим на шестия ден от растежа. Тези стойности са значително по-ниски от получените за клетките от линията RPE-1 и показват сходство с останалите резултати, отразяващи сравнителния анализ между двете клетъчни линии.

Тенденцията към повишаване на трансепителната резистентност след деня на инкубацията се запазва и при ARPE-19 клетките и те бързо достигат нива близки до тези на нетретирани клетки още на седмия ден. Подобно на данните получени за RPE-1 клетките, и тук не се установява съществено влияние върху пермеабилитета на монослоя в резултат от действието на некаталитичната субединица VAC.

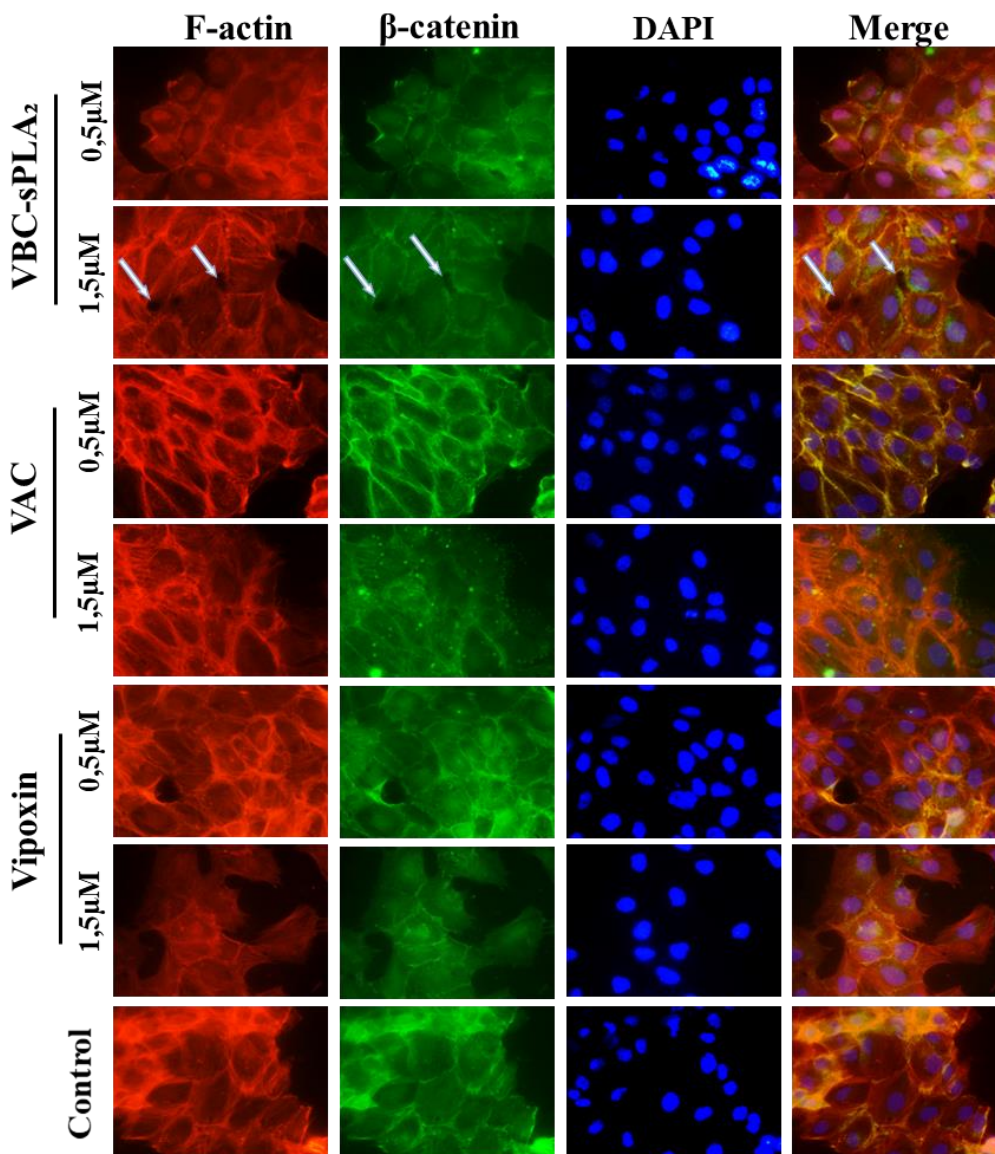
4.5 Изследване въздействието на випоксин, VBC-sPLA₂ и VAC върху реорганизацията на актиновия цитоскелет и β -катенина в ретинални пигментни клетки-RPE-1 и ARPE-19

Бариерните свойства на епителните клетки се регулират по сложен механизъм, в който централно място заемат актиновия цитоскелет и междуклетъчните контакти (Rodgers & Fanning, 2011). Редица проучвания показват, че промени в реорганизацията на актиновите микрофиламенти се явяват ключов механизъм, който посредничи за нарушаване контакта между клетките и увеличаване на пермеабилитета на клетъчния монослой (Ivanov, 2010). Измененията в устройството на F-актиновия цитоскелет влияят също върху формата на клетките, клетъчната адхезия, пролиферация, клетъчна поляризация и др. Една от основните характеристики на епителната бариера с важно значение за нейната цялост са адхезивните комплекси, в които взема участие протеинът β -катенин (BC) (Tian et al., 2011). Той медира клетъчната адхезия като се свързва с цитоплазмения домен на E-кадхерина, а посредством α -катенина свързва комплекса с актиновия цитоскелет. Освен мембранносвързаната форма, той се среща в цитозола и ядрото (Kikuchi, 2000). β -катенинът има важна роля и в регулацията на WNT трансдукционния сигнален път (Clevers, 2012).

След като бяха установени нарушения в бариерните функции на монослоя при изследваните RPE клетъчни линии, беше необходимо да се проследи влиянието на випоксин и компонентите му върху организацията на актиновия цитоскелет и

разпределението на белтъка β – катенин в RPE-1 и ARPE-19 клетките. За целта беше извършена флуоресцентна визуализация на F-актина чрез белязан с TRITC фалоидин (TRITC-Phalloidin) и имунофлуоресцентна детекция на белтъка β –катенин непосредствено след инкубация на клетките с две различни концентрации (0,5 и 1,5 μM) на випоксин, мономерните VBC-sPLA₂ и VAC в продължение на 1 час. Резултатите от експеримента са представени на фигури 8 и 9.

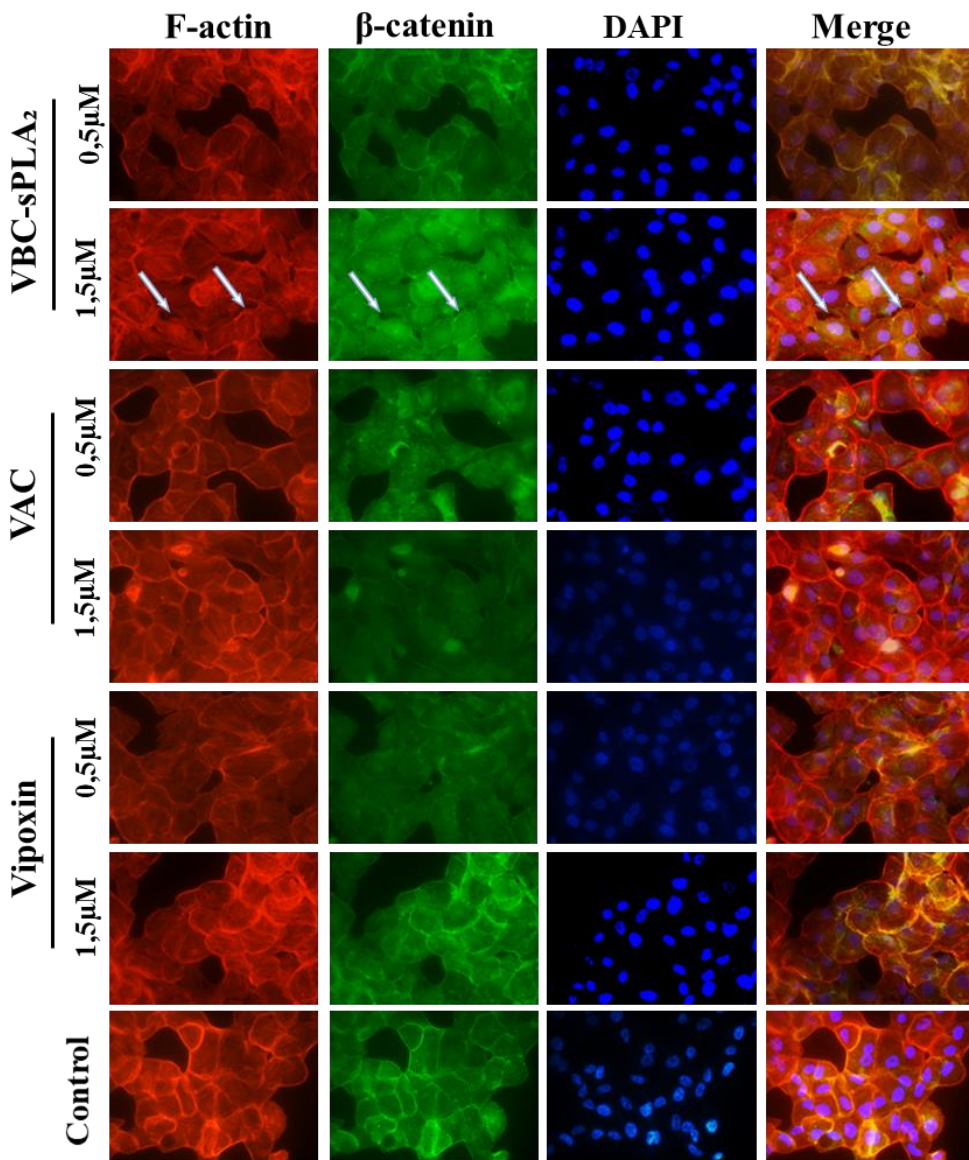
При клетките от линията RPE-1 се наблюдават добре разграничими промени в организацията на актиновия цитоскелет в резултат от въздействието с VBC-sPLA₂ в сравнение с нетретираните клетки (Фиг. 8). По-ясно този ефект се забелязва при клетките инкубирани с по-високата концентрация на ензима (1,5 μM), където се забелязва уплътняване на актиновите филаменти по външните граници на клетките и увеличаване на „стрес влакната“ за разлика от контроните клетки, за които е характерен диспергиран актин.



Фигура 8. RPE-1 клетки (2.5×10^4), третираны за 2 часа с две различни концентрации (0,5 μM и 1,5 μM) VBC-sPLA₂, VAC и випоксин. F-актинът е оцветен в червено (TRITC/Phalloidin), β -катенинът в зелено (Alexa Fluor 488), а клетъчните ядра са визуализирани в синьо (DAPI). В дясно са дадени изображения с оцветяване и на трите структури.

Това би могло да се разглежда като естествена защитна и компенсаторна реакция на клетките спрямо ензимното действие. В някои участъци деполимеризацията на актина води до ретракция на мембраната и отделяне на клетките една от друга с формиране на празни пространства между тях (Фиг. 8 стрелки). Тези промени се потвърждават и от разпределението на белтъка β - катенин. Докато в граничните области на контролните клетки, се формират плътни и непрекъснати ивици от белтъка, при третираните с VBC-

sPLA₂ клетки целостта им на места е нарушена, което е съпроводено с дисоциация на контакта между клетките (бели стрелки).



Фигура 9. ARPE-19 клетки ($2,5 \times 10^4$), третирани за 2 часа с две концентрации (0,5 μM и 1,5 μM) VBC-sPLA₂, VAC и випоксин. F-актинът е оцветен в червено (TRITC/Phalloidin), β-катенинът в зелено (Alexa Fluor 488), а клетъчните ядра в синьо (DAPI).

От изображенията, представени на фигура 9 се вижда, че явленията наблюдавани при RPE-1 клетките са по-слабо застъпени при клетките от линията ARPE-19, при които се очертава ясно обособена ивица на актина по периферията, подобно на контролните

клетки. Въпреки това при по-високата концентрация на мономерната ензимна субединица на комплекса отново се забелязват „пролуки“ между клетките, в които липсват актин и β -катенин. На някои места се наблюдават разлики в очертанията на клетките като се формират тънки нишковидни протракции в зоните на отдръпване на клетките една от друга (Фиг. 9 стрелки). Граничните ивици съставени от белтъка β -катенин се явяват редуцирани, а част от него се наблюдава във вътрешността на клетките.

Сравнително по-слабо влияние върху организацията на актиновия цитоскелет беше установено при въздействие с еднакви концентрации на хетеродимерния комплекс випоксин и при двете ретинални линии. При клетките от линията RPE-1 получените сигнали сочат за наличие на уплътняване на границите в резултат от действието на комплекса, което е в по-голяма степен при въздействие с по-високата концентрация (Фиг. 8). Имунофлуоресцентните изображения за белтъка β -катенин показват, че третирането на клетките с 1,5 μ M випоксин води до появата на по-слабо оцветяване за този протеин в някои гранични участъци и по-усиленото му присъствие в цитоплазменото пространство. Тези промени са по-слабо забележими при ARPE-19 клетките, което отговаря на получените до момента данни за клетъчния отговор на тази линия (Фиг. 9).

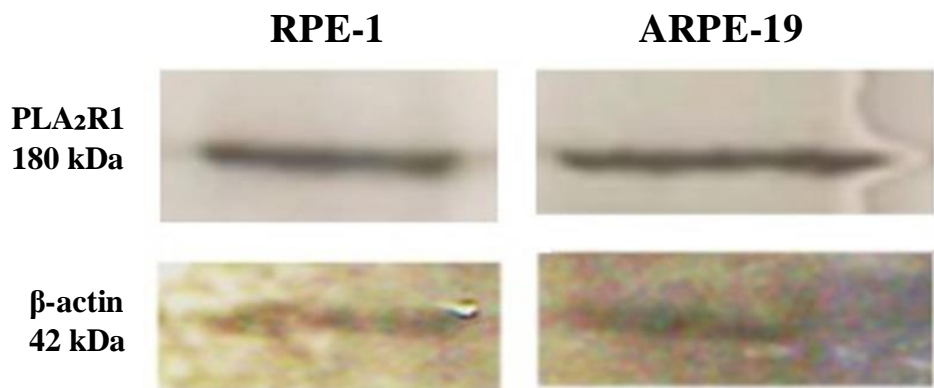
Действието на некаталитичния компонент VAC не води до промени в динамиката на цитоскелетните елементи и разпределението на β – катенин в RPE-1 и ARPE-19 клетките. И при двете клетъчни линии актинът е разположен предимно в периферните области на клетките като формира плътни очертания без да се забелязват стрес влакна. Разпределението на β – катенина също остава непроменено и не се установява загуба на междуклетъчна адхезия.

Тези резултати отново доказват, че мономерният каталитичен компонент VBC на випоксина медира най-силно изразени ефекти, като според получените данни VBC-sPLA₂ индуцира реорганизация на актиновите филменти, нарушаване на адхезивните клетка-клетка контакти и формиране на междуклетъчни пространства, което кореспондира с понижените бариерни свойства на монослоя, установени при измерването на TEER.

4.6 Имунодетекция на PLA₂R1 – M - рецептор за sPLA₂ в мембраните на RPE-1 и ARPE-19 клетки

Липсата на директна връзка между ензимна активност и проявата на разнообразни клетъчни и патофизиологични въздействия води до появата на схващането, че някои от специфичните ефекти на фосфолипаза A₂ ензимите се дължат на т. нар. „фармакологични“ участъци, различни от каталитичния активен център. Доказателство за това е свързването на sPLA₂ със специфични рецептори, при което се отключват различни биологични активности (Triggiani et al., 2006; Rouault et al., 2007; Beck et al., 2006). В литературата са описани основно два типа рецептори, които свързват секреторните фосфолипази A₂ – M-рецептори (миогенни) и N-рецептори (невронни).

За да допуснем съществуването и ролята на некаталитичен „фармакологичен“ механизъм в действието на изолираната от *Vipera ammodytes meridionalis* секреторна фосфолипаза A₂ беше необходимо първоначално да установим наличието на специфичен рецептор в изследваните клетъчни линии от ретинален пигментен епител. За тази цел клетъчни лизати от двете изследвани линии бяха подложени на имунодетекция с антитяло, разпознаващо миогенния рецептор PLA₂R1. (Фигура 10).



Фигура 10. Имунодетекция на PLA₂R1 при RPE-1 и ARPE-19 клетъчни линии.

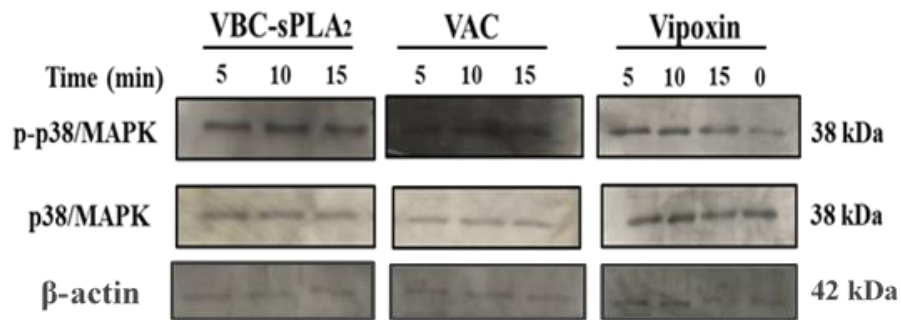
Резултатите от имуноблота показват имунореактивност при 180 kDa, което съответства точно на изследвания рецептор PLA₂R1. Това потвърждава, че и двете използвани клетъчни линии (RPE-1 и ARPE-19) притежават този рецептор, което от своя страна е предпоставка за свързването му с VBC-sPLA₂, VAC и хетеродимерния випоксин,

и потенциалното инициране на определени сигнални механизми. Потвърждаването на присъствието на този рецептор, в мембраните на клетките от използваните клетъчни линии, дава основание да се изследват механизмите на фармакологичното действие на невротоксина випоксин и неговите индивидуални субединици, което би довело до задълбочаване на познанията ни за различните патологични/терапевтични аспекти на действието на фосфолипазите A2 и техните некаталитични аналози.

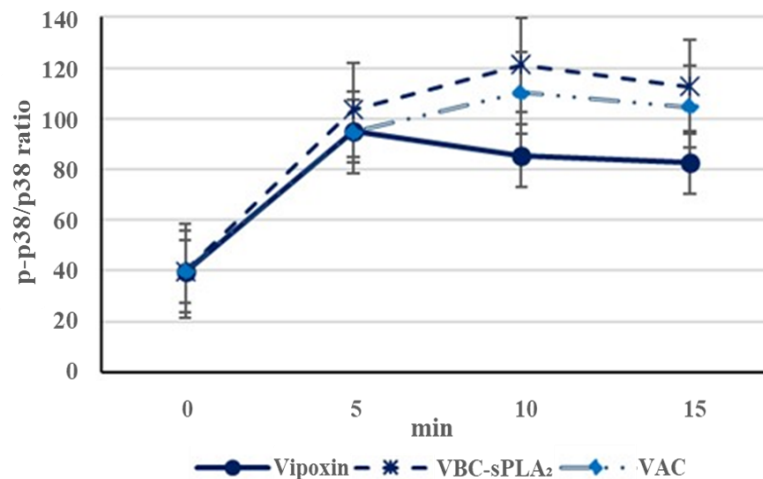
4.7 Активация на p38 MAPK в RPE-1 клетки, третирани с VBC-sPLA₂, VAC и Vipoxin

Митоген активираните протеин кинази (МАРК) медираат голямо разнообразие от клетъчни ефекти в отговор на физични и химични външни въздействия (Cuenda A et al., 2007). Една от субгрупите в семейството на МАРК киназите включва т. нар. p38 МАРК кинази, които се активират в резултат от влиянието на стресови стимули и действието на проинфламаторни цитокини. Класическия модел на активация включва двойно фосфорилиране на специфичен мотив (Thr-Gly-Tyr) от страна на МКК3 и МКК6 (Kyriakis J.M et al., 2001). Фосфорилираните p38 МАРК кинази претърпяват конформационни изменения, улесняващи достъпа им до субстрата, което води до повишаване на ензимната им активност.

Клетките от линията RPE-1 показаха повишена чувствителност спрямо действието на випоксин и неговите самостоятелни субединици, което даде основание да се установи дали медираните от тях ефекти включват активация на p38 МАРК киназата, чрез проследяването на сигналния път, отговорен за некаталитичния механизъм на активация, задействан от специфичните мембранны рецептори. С цел да се установи дали хетеродимерния комплекс и изграждащите го субединици предизвикват промяна в нивото на фосфорилиране, респективно активността, на p38 МАРК киназата, RPE-1 клетки бяха третирани с випоксин, VBC-sPLA₂ и VAC в концентрация 5µM в продължение на различни времеви интервали от 5, 10 и 15 мин, а нивото на фосфорилиране на изследваната киназа беше отчетено чрез имунблот, в който бяха използвани специфични антитела за детекция на общата и фосфорилираната форма на p38 МАРК киназата (Phospho-p38 МАРК (Thr180/Tyr182)). Резултатите за представени на фигура 11 и 12.



Фигура 11. Имуноблот анализ показващ количеството фосфорилирана p38 MAPK киназа. Клетки от линията RPE-1 са третирани с VBC-sPLA₂, VAC и випоксин в концентрация 5 μM в продължение на 5, 10 и 15 мин.



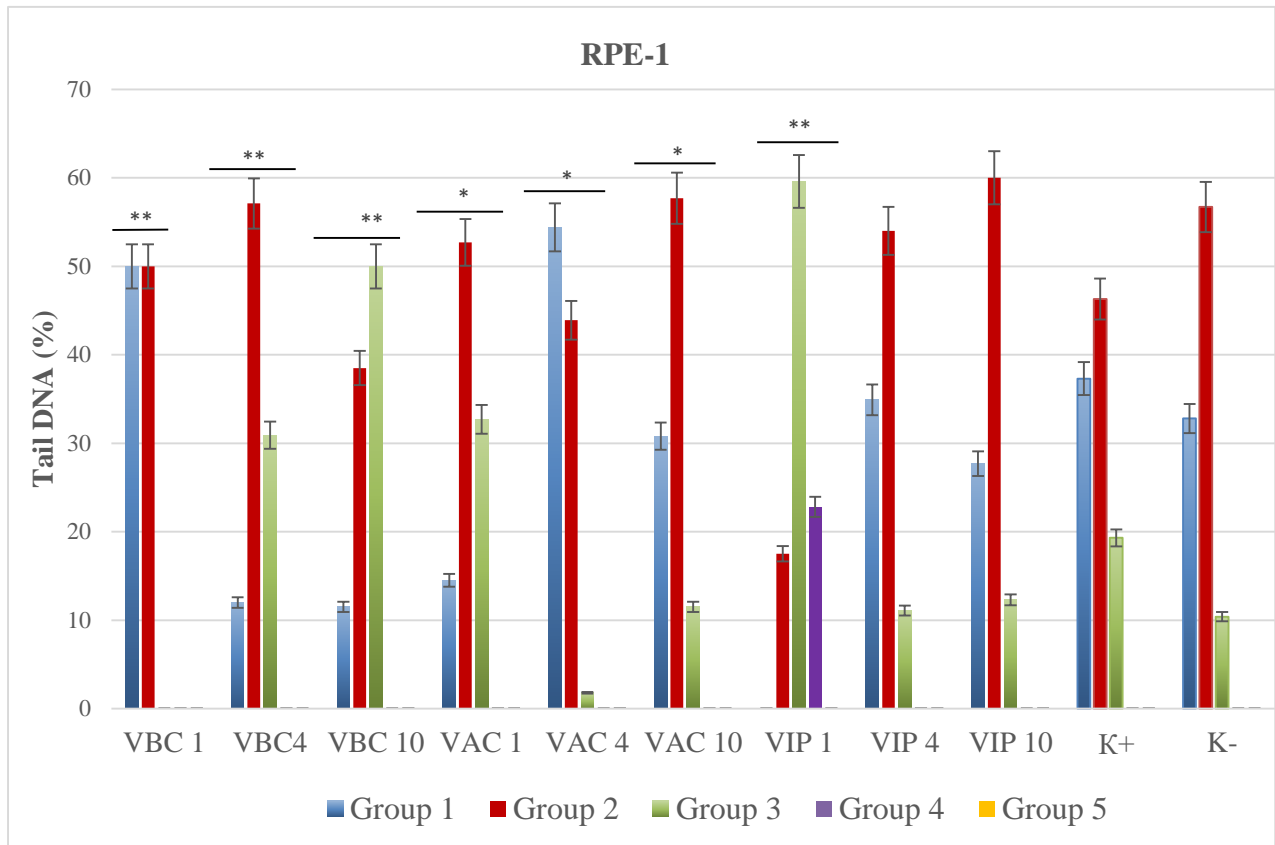
Фигура 12. Графично представяне на количественото съотношение на нивото на фосфорилираната p38 MAPK отнесено към вътрешната контролна тотална p38 MAPK.

Както се вижда от представените графики, нетретираниите клетки показват базово ниво на фосфорилиране на p38 MAPK киназата. Въздействието върху RPE-1 клетките с VBC-sPLA₂, VAC и Vipoxin в концентрация от 5 μM доведе до силно увеличаване на нивата на фосфорилиране на p38 MAPK в сравнение с контролните клетки. Анализът на данните получени при третиране на клетките за различни времеви интервали показва, че фосфорилирането на киназата се открива веднага след изтичане на 5-тата минута от инкубацията като се задържа във високи нива и след 15-тата минута (Фиг. 11). Този резултат се наблюдава при въздействие върху клетките и с трите изследвани компонента и показва, че както хетеродимерният комплекс, така и отделните му субединици

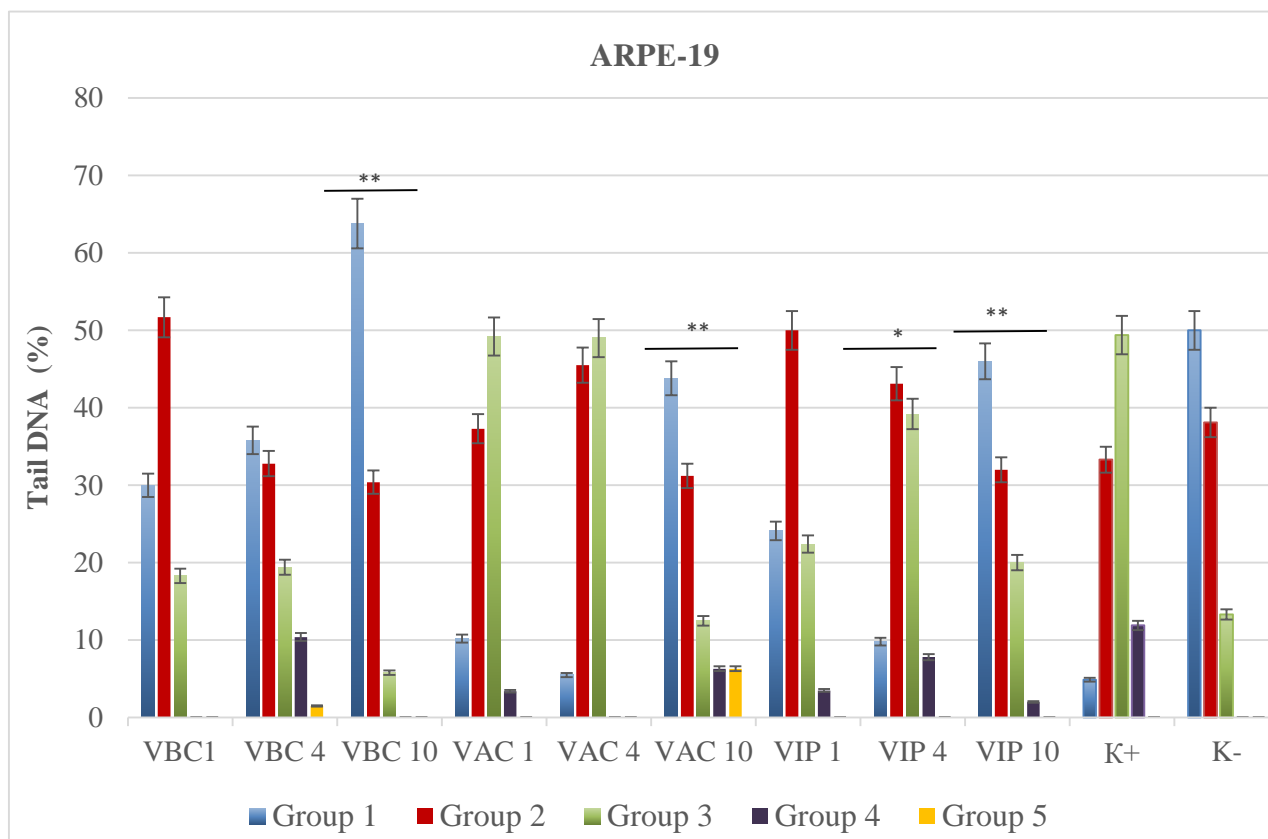
предизвикват моментално и продължително активиране на p38 MAPK киназата в ретиналните клетки от линията RPE-1. Увеличените нива на фосфорилираната форма на киназата, установени след третиране с неензимния компонент VAC е признак, че тези сигнализационни събития в клетката не са провокирани от каталитично действие. Не се наблюдават съществени разлики и в нивата на фосфорилиране, което хетеродимерният токсин и двете мономерни субединици индуцират в клетките.

4.8 Оценка на генотоксичността на sPLA₂ върху RPE-1 и ARPE-19 клетъчни линии

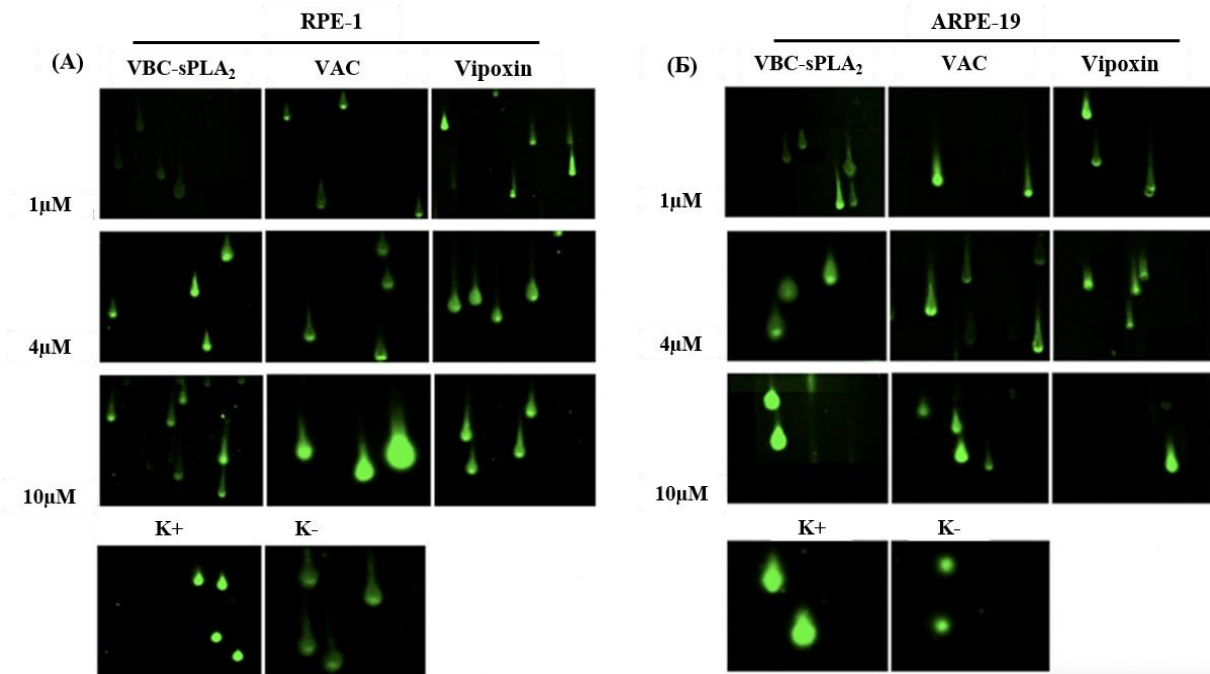
Кометният анализ в неутрални условия е метод, който позволява да се изследва наличието на генотоксичен ефект чрез детекция на двойно-верижни скъсвания в ядрената ДНК. Високата степен на ДНК разграждане до двойно-верижни олигонуклеозомални фрагменти, се разглежда като маркер за апоптоза, инициирана посредством активирането на CAD (caspase-activated DNase), причинена от ефектора каспаза-3 (Janicke et al., 1998; Nagata, 2000). За да се установи дали випоксин и неговите самостоятелни субединици проявяват генотоксичен ефект върху ретиналните пигментни клетки, двете клетъчни линии бяха третирани с три различни концентрации (1 μ M, 4 μ M и 10 μ M) на випоксин, VBC-sPLA₂ и VAC в продължение на два часа, след което бяха подложени на кометен анализ. За по-ясно илюстриране на резултатите преброените комети бяха обособени в няколко условни групи според нивото на ДНК увреждане (Фиг. 13 и 14).



Фигура 13 А. Кометен анализ на RPE-1 клетки след третиране с различни концентрации на VBC-sPLA₂, VAC и випоксин в продължение на 2 часа. Група I – комети с по-малко от 20% увредена ядрена ДНК в кометната опашка. Група II – комети с 20 до 40% увредена ядрена ДНК в кометната опашка. Група III – 40 до 60% увредена ядрена ДНК в кометната опашка. Група IV – 60 до 80% увредена ядрена ДНК в кометната опашка. Група V – силно увредена ядрена ДНК с над 80% в кометната опашка. Статистически значими различия: ** $p < 0.01$, * $p < 0.05$ в сравнение с отрицателната контрола (one-way ANOVA последван от Dunnett's test).



Фигура 13 Б. Кометен анализ на ARPE-19 клетки след третиране с различни концентрации на VBC-sPLA₂, VAC и випоксин в продължение на 2 часа. Група I – комети с по-малко от 20% увредена ядрена ДНК в кометната опашка. Група II – комети с 20 до 40% увредена ядрена ДНК в кометната опашка. Група III – 40 до 60% увредена ядрена ДНК в кометната опашка. Група IV – 60 до 80% увредена ядрена ДНК в кометната опашка. Група V – силно увредена ядрена ДНК с над 80% в кометната опашка. Статистически значими различия: ** $p < 0.01$, * $p < 0.05$ в сравнение с отрицателната контрола (one-way ANOVA последван от Dunnett's test).



Фигура 14. Микроскопски изображения от кометния анализ на RPE-1(A) и ARPE-19 (Б) клетки след третиране с различни концентрации на VBC-sPLA₂, VAC и випоксин в продължение на 2 часа.

Според получените резултати въздействието на VBC-sPLA₂ върху клетъчната линия RPE-1 предизвиква увреждане на ядрената ДНК като степента на увреждане е пропорционална на нарастващите концентрации. При използването на най-ниската концентрация от 1 μM клетките образуват комети от I и II група, докато при по-високите концентрации се установяват комети от III група, като броят им нараства от 31% при третиране с 4 μM до 50% за 10 μM (Фиг. 13 А). Обратно, хетеродимерният комплекс випоксин проявява по-добре изразен генотоксичен ефект върху клетките при въздействие с най-ниската концентрация, където ~60% от кометите се отнасят към група III, а 23% спадат към група IV. По-високите концентрации на хетеродимерния комплекс причиняват по-слабо увреждане на клетъчната ДНК, подобно на наблюдавания ефект при отрицателната контрола. Кометният анализ, изненадващо, показва способността на самостоятелната некаталитична субединица на випоксина - VAC да предизвиква ДНК скъсвания в RPE-1 клетките, което поставя въпроса за биологичната роля на VAC и механизмите на интернализация/сигнализация в клетките. Стойностите от графиката на фигура 13 А показват, че въздействието с VAC в концентрация от 1 μM води до появата на

комети спадащи към група III (~33%), ефект наподобяващ този установен при действието на ензимната субединица на комплекса. При по-високи концентрации на VAC, преобладава разпределението на кометите в група I и II, характеризиращи се с по-ниска степен на увреждане. Тази понижена активност на VAC свързана с увеличаването на неговата концентрацията може да се дължи на добре изразената му способност да формира димери в разтвор (Georgieva et. al 2004).

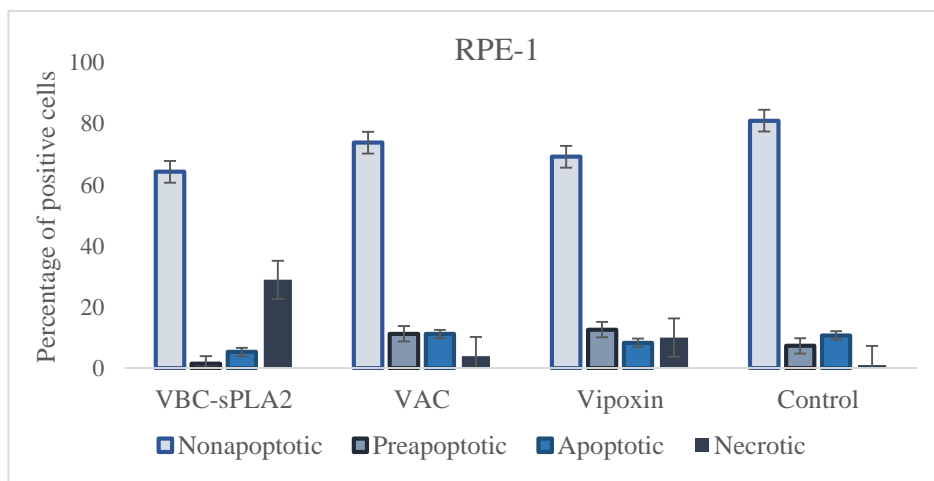
Кометният анализ на клетъчната линия ARPE-19 след третиране с випоксин и мономерните му субединици показва наличие на генотоксичен ефект, в някои случаи надвишаващ този установен при линията RPE-1 (Фиг. 13 Б). Индивидуалната ензимна субединица VBC-sPLA₂ предизвиква ДНК повреди в ARPE-19 клетките без да се забелязва ясно очертан концентрационно-зависим характер. Най-силно влияние върху геномния интегритет оказва концентрацията от 4μM, където около 20% от кометите принадлежат към група III, а около 10% към група IV. Значителна степен на ДНК увреждане причинява инкубацията на клетките с нетоксичния компонент VAC, при което се установяват около 49% комети от група III за концентрациите 1μM и 4μM. Най-силно влияние в резултат от действието на хетеродимерния комплекс випоксин се забелязва при третиране с 4μM, при което се образуват приблизително 39% комети от III група и 7% от група IV.

Получените данни от кометния анализ ясно показват способността на випоксина и неговите самостоятелни субединици да индуцират повреди в клетъчната ДНК на RPE-1 и ARPE-19 клетките. Най-вероятно, ДНК повредите се дължат на комбинираното действие на каталитични и некаталитични механизми в които се включват и продуктите на ензимната хидролиза – лизофосфолипиди и свободни МК, които са важни сигнални посредници на множество сигнални пътища, които в крайна сметка повлияват стабилността на ДНК. От друга страна, фармакологичния механизъм, който предполага специфично свързване на токсините с мембранен рецептор и последващото им интернализиране в клетката, също е свързано със сигнални пътища, чиито продукти повлияват ядрените процеси и отключват генотоксично действие. Доказателство за това е ясно очертаният потенциал на некаталитичната субединица VAC да иницира ДНК

повреди. Подобен некаталитичен механизъм не е изключен и за действието на ензима, тъй като физиологичната роля на sPLA₂с не се свежда само до ензимното им действие.

4.9 Детекция на апоптоза в ретинални пигментни клетки от линиите RPE-1 и ARPE-19 след третиране с випоксин, VBC-sPLA₂ и VAC

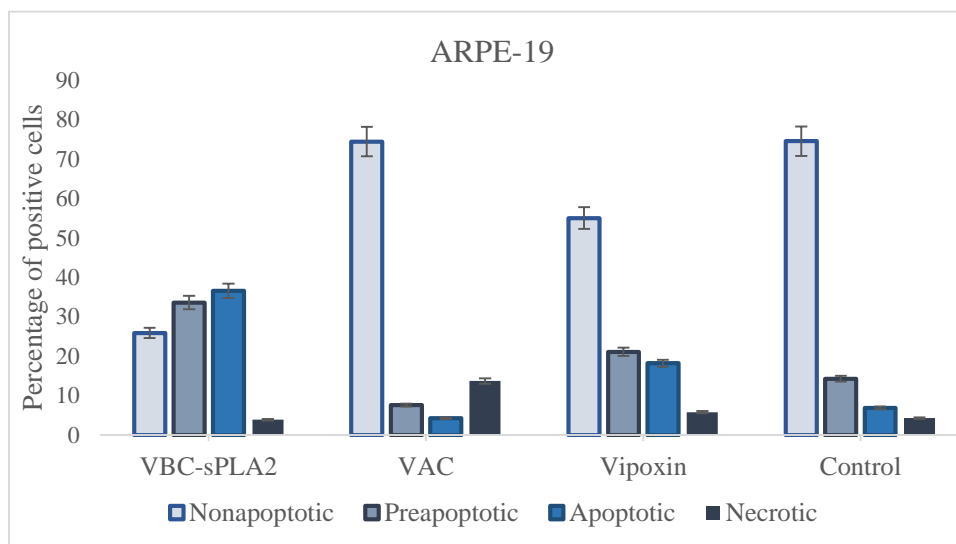
За допълнително изясняване на механизмите, чрез които випоксина и неговите два пречистени мономера оказват своето негативно влияние върху ретиналните пигментни клетки от линиите RPE-1 и ARPE-19, беше необходимо да се установи дали клетъчният отговор отключва апоптотични или некротични сигнали. За тази цел беше проведен анализ за определяне нивото на апоптоза с помощта на поточен цитометър (Guava easyCyte Flow Cytometer, Cytex) и търговския кит Guava Nexin dye reagent, съдържащ анексин V и 7-аминоактиномицин (7-AAD). Клетките от двете линии RPE-1 и ARPE-19 бяха анализирани за наличие на белези на апоптоза след третиране с випоксин, VBC-sPLA₂ и VAC в концентрация от 10 μM (Фиг. 15).



Фигура 15 А. Нива на апоптоза в линията RPE-1 (2.0×10^5 клетки/ямка) след инкубиране с VBC-sPLA₂, VAC и випоксин в продължение на 2 часа. Според наличието на положително оцветяване с AnnexinV и 7-AAD клетките са групирани както следва: незасегнати клетки – Annexin(-) 7-AAD(-), клетки в ранна апоптоза – Annexin(+) 7-AAD(-), клетки в късна апоптоза – Annexin(+) 7-AAD(+), некротични (клетъчни останки) – Annexin(-) 7-AAD(+).

Получените резултати показват, че след въздействие с каталитичната субединица VBC-sPLA₂, незначителна част от RPE-1 клетките демонстрират белези на ранна и късна

апоптоза, а ~30% от клетките се намират в стадий некроза. За разлика от това, при клетъчната линия ARPE-19 действието на фосфолипаза A₂ води до появата на по-висок процент ранно апоптични и късно апоптични клетки (~34% и ~37%, съответно) и само около 4% некротични клетки. Нетоксичният компонент VAC не индуцира сериозни клетъчни изменения, характерни за апоптогичния процес и при двете клетъчни линии. Въпреки това, прави впечатление, че в резултат от действието му, при ARPE-19 клетките се установява по-висок процент некротични клетки в сравнение с линията RPE-1, което е още една индикация за отличаващия се подход на взаимодействие с двете клетъчни линии.



Фигура 15 Б. Нива на апоптоза в линията ARPE-19 (2.0×10^5 клетки/ямка) след инкубиране с VBC-sPLA₂, VAC и випоксин в продължение на 2 часа. Според наличието на положително оцветяване с AnnexinV и 7-AAD клетките са групирани както следва: незасегнати клетки – Annexin(-) 7-AAD(-), клетки в ранна апоптоза – Annexin(+) 7-AAD(-), клетки в късна апоптоза – Annexin(+) 7-AAD(+), некротични (клетъчни останки) – Annexin(-) 7-AAD(+).

При въздействие с хетеродимерния комплекс випоксин при клетките от линията RPE-1 се установяват около 12% клетки намиращи се в ранна апоптоза, 8% в късна апоптоза и 10% некротични клетки. При линията ARPE-19 в резултат от действието на токсина преобладават клетките с апоптични признаци (21% в ранна и 18% късна апоптоза).

Резултатите от цитометричното изследване разкриват, че випоксина и неговите самостоятелни субединици осъществяват влияние върху RPE клетки от двете изследвани линии, чрез механизъм, който включва както апоптоза, така и некроза. В съответствие с

результатите от предходните експерименти, най-висок брой увредени клетки се наблюдават след инкубация на клетките с VBC-sPLA₂. Третираните с ензимната субединица RPE-1 клетки показват по-голям брой некротични клетки и в по-малка степен клетки в апоптоза в сравнение с линията ARPE-19. Би могло да се предположи, че VBC-sPLA₂ повлиява клетките от линията RPE-1 предимно чрез хидролитичното си действие, което води до съществени нарушения в мембрания интегритет и последващи некротични процеси, докато при клетките от линията ARPE-19 вероятно преобладава фармакологичната активност на субединицата, която причинява по-малко инвазивни изменения в плазмената мембрана, в резултат на което се задейства апоптотичната програма. Макар и слабо уловим, ефектът на некаталитичната субединица VAC предизвиква предимно апоптоза в клетките на линията RPE-1 и некроза в клетките на линията ARPE-19, което вероятно е свързано с по-високия процент на ДНК повреди установени за тази линия. Хетеродимерният комплекс випоксин оказва смесено влияние върху клетките от двете линии, активирайки апоптоза и некроза, което дава индикация, че влиянието му е комбинация от съвместното действие на двете му съставни субединици. Тези данни отразяват съществуването на сложен и комплексен механизъм в основата на взаимодействието на випоксин и неговите компоненти с клетъчните мембрани на ретиналните пигментни клетки.

В настоящото проучване беше изследвано влиянието на хетеродимерния комплекс випоксин и неговите пречистени субединици върху две моделни клетъчни линии от ретинален пигментен епител. Беше установено наличие на цитотоксично и генотоксично действие, нарушения на мембрания интегритет, реорганизация на актиновия цитоскелет и промяна в разпределението на белтъка β -катенин, повишаване на пропускливостта на клетъчния монослой, индукция на апоптоза и активация на митоген активираната протеин киназа p38. Получените резултати дават сведения не само за конкретните въздействия, които хетеродимерния комплекс и неговите компоненти оказват върху изследваните клетъчни линии, но и разкриват важни особености за динамиката на взаимодействие и структурно-функционалните характеристики на целия комплекс и изграждащите го мономери.

Випоксинът проявява своите многообразни ефекти върху клетъчната физиология комбинирайки каталитични и некаталитични механизми, въз основа на сложни и

непрекъснати структурни взаимодействия между двете субединици. Беше установено, че ензимната активност е отговорна за намалената жизнеспособност и предизвиканите нарушения в мембрания интегритет на клетките, докато инициацията на клетъчни сигнализационни събития, включващи активирането на p38 MAPK киназата се дължат на некаталитичното действие на токсините. Способността на ензимно неактивния компонент VAC да участва в тези процеси обуславя неговата способност самостоятелно да медира специфични фармакологични ефекти. Тези сведения налагат преразглеждане на ролята на некаталитичния компонент на випоксина като инхибитор и предполагат по-широк функционален спектър на субединицата за токсичното действие на комплекса.

Впечатляващо е, че две сходни RPE линии показват различно клетъчно поведение на въздействието на випоксина и неговите индивидуални мономерни субединици. Въпреки че и двете клетъчни линии са ретинален пигментен епител, те произхождат от различни донори, което предопределя генетични различия между тях. Клетките от линията RPE-1 показаха видимо по-висока чувствителност на базата на по-силно манифестираните у тях ефекти в сравнение с тези от линията ARPE-19. Анализът на мембрания липиден състав показва количествени и качествени различия в мембраните на клетките от двете линии, което заедно с отличаващото се клетъчно микроокръжение, обяснява различния модел на взаимодействие на ензимния комплекс и мономерите му с клетъчните повърхности. Необходими са допълнителни механистични изследвания за доказване на биологичната роля на некаталитичната субединица VAC, модулиращият ѝ потенциал за „фармакологичните“ функции на комплекса випоксин и необходимостта и за специфичното таргетиране на VBC към определени клетъчни мембранни домени или рецептори.

5. Изводи

Въз основа на поставените цел и задачи, проведените експерименти и получените резултати, бяха формулирани следните изводи:

1. Випоксин и неговите компоненти повлияват клетъчната преживяемост на ретиналните пигментни клетки като най-висока токсичност е отчетена за самостоятелната VBC-sPLA₂ субединица при линията RPE-1.
2. Випоксин и VBC-sPLA₂ водят до нарушаване на интегритета на плазмената мембрана, засягайки най-силно RPE-1 клетките, докато при линията APRE-19 този ефект е по-слабо проявен.
3. Випоксин и VBC-sPLA₂ нарушават бариерните свойства на клетъчния монослой при изследваните клетъчни линии като действието им засяга в по-чувствително линията RPE-1. Липсата на активност от страна на нетоксичния компонент VAC е сигнал, че тези промени са резултат от хидролитичното разграждане на клетъчните мембрани.
4. Действието на VBC-sPLA₂ предизвиква реорганизация на актиновия цитоскелет, обособяване на клетъчните граници, с участието на актина и β -катенина и загуба на междуклетъчни контакти при клетките от линията RPE-1 и в по-малка степен при линията APRE-19.
5. Клетките от линиите RPE-1 и APRE-19 показват различия по отношение на мембрания липиден състав.
6. Ретиналните пигментни клетки от двете изследвани линии притежават мембрания рецептор PLA₂R1, което определя възможността за специфичното му свързване от ензимния компонент на комплекса и инициирането на поредица от клетъчни събития с некаталитичен характер.
7. Випоксин, VBC-sPLA₂ и VAC водят до активиране на p38MAPK сигнализационната каскада, което е индикация за наличието на фармакологичен механизъм на действие.

8. Випоксин, VBC-sPLA₂ и VAC предизвикват висока степен на ДНК повреди в двете клетъчни линии.
9. Випоксин и двете му самостоятелни субединици показват различна способност да индуцират апоптотични и некротични процеси в клетъчните линии RPE-1 и APre-19, което доказва наличието на различен тип на взаимодействие между комплекса, мономерите му и мембраните на двата типа клетки.

6. Приноси

1. За първи път е изследвано действието на комплекса випоксин и неговите пречистени субединици VBC-sPLA₂ и VAC върху човешки клетки от ретинален пигментен епител.
2. Доказано е наличието на сложна комбинация от каталитични и некаталитични механизми, отговорни за проявата на многообразните ефекти, медиирани от комплекса и мономерите му в клетките от ретинален епител.
3. Установена е важна роля на киселият компонент VAC за функцията на комплекса, чрез доказване способността му да повлиява самостоятелно специфични аспекти от клетъчните функции.
4. Установено е различно влияние от страна на комплекса випоксин и съставните му компоненти върху двете клетъчни култури от ретинален пигментен епител, което доказва значимостта на генетичните фактори, определящи липидния състав и клетъчното микрообкръжение, за биохимичните взаимодействия на токсините с клетъчните мембрани.

Публикации, свързани с темата на дисертацията

1. **Petseva, Y.**; Mladenova, K.; Ganeva, M.; Radeva, V.; Videv, P.; Doumanov, J.; Petrova, S. (2025) Heterodimeric vipoxin and its individual monomeric subunits display a dynamic structure-function relationship on RPE cells, Archives of Biochemistry and Biophysics. 110351.
2. **Petseva, Y.**; Mladenova, K.; Doumanov, J.; Petrova, S. (2024) Snake venoms and their therapeutic potential, Trakia Journal of Sciences, 22, 9.

Участия в научни форуми:

- **Ю. Пецева**, К. Младенова, Й. Думанов, С. Петрова, “*Effect of snake venom Phospholipase A₂ on actin cytoskeleton rearrangement of retinal pigment epithelium cell lines*”, Младежка научна конференция с международно участие „Климентови Дни”, 16 – 17 ноември 2016 г., Биологически факултет”, София.
- **Ю. Пецева**, М. Ганева, К. Младенова, П. Видев, Й. Думанов, С. Петрова, “*Cytotoxicity of PLA₂ VAC and Vipoxin on RPE1 cells*”, Младежка научна конференция с международно участие „Климентови Дни”, 16 – 17 ноември 2017 г., Биологически факултет”, София
- **Ю. Пецева**, К. Младенова, Й. Думанов, С. Петрова, “*Изследване влиянието на секреторна фосфолипаза A₂ върху метаболитната активност и плазмената мембрана на клетки от ретинален пигментен епител*” XXVII Международна научна конференция, 1-2 Юни, 2017, Стара Загора.

- **Ю. Пецева, К. Младенова, Й. Думанов, С. Петрова**, „*Genotoxicity of vipoxin and its components on RPE cells*”, XXVIII Международна научна конференция, 31Май -2 Юни, 2018, СтараЗагора.
- **Ю. Пецева, К. Младенова, П. Видев, Й. Думанов, С. Петрова**, „*Effect of vipoxin and its components on RPE cells*”, VII National Conference with International Participation“Morphological Days”, June 8 –10, Sofia, Bulgaria.

1. Цитирана литература

1. **Atanasov, V., Petrova, S., & Mitewa, M. (2009)**. HPLC assay of phospholipase A2 activity using low-temperature derivatization of fatty acid. *Analytical Letters*, *42*, 1341–1351.
2. **Beck, S., Beck, G., Ostendorf, T., Floege, J., Lambeau, G., Nevalainen, T., & Kaszkin, M. (2006)**. Upregulation of group IB secreted phospholipase A2 and its M-type receptor in rat anti-THY-1 glomerulonephritis. *Kidney International*, *70*, 1251–1260.
3. **Berg, O., Gelb, M., Tsai, M., & Jain, M. (2001)**. Interfacial enzymology: The secreted phospholipase A(2) paradigm. *Chemical Reviews*, *101*, 2613–2654.
4. **Berridge, V., & Tan, S. (1993)**. Characterization of the cellular reduction of 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT): Subcellular localization, substrate dependence, and involvement of mitochondrial electron transport in MTT reduction. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, *303*(2), 474–482.
5. **Cho, W., & Kezdy, F. (1991)**. Chromogenic substrates and assay of phospholipases A2. *Methods in Enzymology*, *197*, 75–79.
6. **Clevers, H., & Nusse, R. (2012)**. Wnt/ β -catenin signaling and disease. *Cell*, *149*(6), 1192–1205.
7. **Cuenda, A., & Rousseau, S. (2007)**. p38 MAP-kinases pathway regulation, function and role in human diseases. *Biochimica et Biophysica Acta*, *1773*(8), 1358–1375.
8. **Dennis, E., Cao, J., Hsu, Y., Magrioti, V., & Kokotos, G. (2011)**. Phospholipase A2 enzymes: Physical structure, biological function, disease implication, chemical inhibition, and therapeutic intervention. *Chemical Reviews*, *111*, 6130–6185.
9. **Doumanov, J., Mladenova, K., Aleksandrov, R., Danovski, G., & Petrova, S. (2014)**. Investigation of pharmacologically active snake venom sPLA2 with different cell lines. *Biotechnology and Biotechnological Equipment*, *28*(5), 918–922.
10. **Doumanov, J., Mladenova, K., Aleksandrov, R., Danovski, G., Petrova, S., & Mitewa, M. (2015)**. Effects of vipoxin and its components on HepG2 cells. *Toxicon*, *94*, 36–44.
11. **Folch, J., Lees, M., & Sloane Stanley, G. H. (1957)**. A simple method for the isolation and purification of total lipides from animal tissues. *Journal of Biological Chemistry*, *226*(1), 497–509.
12. **Frangides, C., Koulouras, V., Kouni, S., Tzortzatos, G., Nikolaou, A., Pneumaticos, J., & Koutsojannis, C. (2006)**. Snake venom poisoning in Greece: Experiences with 147 cases. *European Journal of Internal Medicine*, *17*, 24–27.

13. **Georgieva, D.**, Genov, N., Hristov, K., Dierks, K., & Betzel, C. (2004). Interactions of the neurotoxin vipoxin in solution studied by dynamic light scattering. *Biophysical Journal*, 86, 461–466.
14. **Holzer, M.**, & Mackessy, S. (1996). An aqueous endpoint assay of snake venom phospholipase A2. *Toxicon*, 34, 1149–1155.
15. **Ivanov, A. I.**, Parkos, C. A., & Nusrat, A. (2010). Cytoskeletal regulation of epithelial barrier function during inflammation. *American Journal of Pathology*, 177, 512–524.
16. **Janicke, R.**, Sprengart, M., Wati, M., Porter, A., (1998). Caspase-3 is required for DNA fragmentation and morphological changes associated with apoptosis. *J. Biol. Chem.* 273 (16), 9357-9360.
17. **Kang, T. S.**, Georgieva, D., Genov, N., Murakami, M. T., Sinha, M., Kumar, R. P., & Kini, R. M. (2011). Enzymatic toxins from snake venom: Structural characterization and mechanism of catalysis. *FEBS Journal*, 278(23).
18. **Kikuchi, A.** (2000). Regulation of beta-catenin signaling in the Wnt pathway. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2, 243–248.
19. **Kini, R. M.** (1997). Phospholipase A2—a complex multifunctional protein puzzle. In R. M. Kini (Ed.), *Venom Phospholipase A2 Enzymes: Structure, Function and Mechanism* (pp. 1–28). John Wiley & Sons.
20. **Kini, R. M.**, & Evans, H. J. (1989). A model to explain the pharmacological effects of snake venom phospholipases A2. *Toxicon*, 27(6), 613–635.
21. **Kyriakis, J. M.**, & Avruch, J. (2001). Mammalian mitogen-activated protein kinase signal transduction pathways activated by stress and inflammation. *Physiological Reviews*, 81, 807–869.
22. **Laemmli, U. K.** (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 227, 680–685.
23. **Nagata, S.**, (2000). Apoptotic DNA fragmentation. *Exp. Cell. Res.* 256 (1), 12-18.
24. **Olive, P.**, & Banath, J. (2006). The comet assay: A method to measure DNA damage in individual cells. *Nature Protocols*, 1, 23–29.
25. **Petan, T.**, Križaj, I., Gelb, M., & Pungertar, J. (2005). Ammodytoxins, potent presynaptic neurotoxins, are also highly efficient phospholipase A2 enzymes. *Biochemistry*, 44(37), 12535–12545.
26. **Ponce-Soto, L.**, Toyama, M., Hyslop, S., Novello, J., & Marangoni, S. (2002). Isolation and preliminary enzymatic characterization of a novel PLA2 from *Crotalus durissus collilineatus* venom. *Journal of Protein Chemistry*, 21, 131–136.
27. **Robinson, S. D.**, Undheim, E. A. B., Ueberheide, B., & King, G. F. (2017). Venom peptides as therapeutics: Advances, challenges and the future of venom-peptide discovery. *Expert Review of Proteomics*, 14(10), 931–939.
28. **Rodgers, L. S.**, & Fanning, A. S. (2011). Regulation of epithelial permeability by the actin cytoskeleton. *Cytoskeleton*, 68, 653–660.
29. **Rouault, M.**, Le Calvez, C., Boilard, E., Surrel, F., Singer, A., Ghomashchi, F., & Lambeau, G. (2007). Recombinant production and properties of binding of the full set of mouse secreted phospholipases A2 to the mouse M-type receptor. *Biochemistry*, 46, 1647–1662.
30. **Shipolini, R.**, Ivanov, C., Aleksiev, B., & Ganchev, K. (1970). Preliminary studies on the isolation and physiological action of fractions from the venom of *Vipera ammodytes ammodytes*. *Comptes Rendus de l'Académie Bulgare des Sciences*, 23, 279–282.
31. **Stoscheck, C.** (1990). Quantitation of protein. *Methods in Enzymology*, 182, 50–69.
32. **Tchorbanov, B.**, & Aleksiev, B. (1981). A simple procedure for the isolation of Vipoxin – a neurotoxin with phospholipase A2 activity from the venom of the Bulgarian viper (*Vipera ammodytes*). *Journal of Applied Biochemistry*, 3, 558–561.

33. **Tian, X.**, Liu, Z., Niu, B., Zhang, J., Tan, T. K., Lee, S. R., & Zheng, G. (2011). E-cadherin/ β -catenin complex and the epithelial barrier. *Journal of Biomedicine and Biotechnology*, 2011, 567305.
34. **Triggiani, M.**, Granata, F., Frattini, A., & Marone, G. (2006). Activation of human inflammatory cells by secreted phospholipases A2. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1761, 1289–1300.