

**КИЇВСЬКИЙ НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ
ІМЕНІ ТАРАСА ШЕВЧЕНКА**

ННЦ «Інститут біології та медицини»
Кафедра біохімії

Завідувач кафедри проф. Олексій САВЧУК

Протокол № ____ засідання кафедри

від “ ____ ” _____ 20 ____ р.

**АДАПТОГЕННІ ВЛАСТИВОСТІ HB-EGF У РЕГУЛЯЦІЇ СТРЕС-
ІНДУКОВАНИХ ЗМІН У КЛІТИНІ**

Випускна кваліфікаційна робота
студента денної форми навчання
за спеціальністю Біологія та біохімія
Дідан Анастасії Валентинівни

Науковий керівник від кафедри
канд. біол. наук, доц. Юет А.С.

Робота виконана у відділі молекулярної імунології Інституту біохімії ім.
О.В. Палладіна НАН України під керівництвом старш. наук. співроб., канд.
біол. наук Сіромолота Андрія Андрійовича

Оцінка захисту роботи

Київ – 2026 р.

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ СКОРОЧЕНЬ

БСА	–	бичачий сироватковий альбумін;
ДМСО	–	диметилсульфоксид;
ДСН	–	додецилсульфат натрію;
ЕДТА	–	етилендіамінтетраоцтова кислота;
ДТ	–	дифтерійний токсин;
ЗФР	–	забуферений фізіологічний розчин;
ІПТГ	–	ізопропіл- β -D-1-тіогалактопіранозид;
МТТ	–	3-(4,5-диметилтіазол-2-іл)-2,5-дифенілтетразолій бромід;
НЕК	–	некротичний ентероколіт;
ПААГ	–	поліакриламідний гель;
ТЕМЕД	–	тетраметилетилендіамін;
Трис	–	трис(гідроксиметил)амінометан;
ФБС	–	фетальна бичача сироватка;
УФ	–	ультрафіолетове випромінювання;
ADAM	–	disintegrin and metalloproteinase (дизінтегрин та металопротеїназа);
DMEM	–	Dulbecco's modified Eagle's medium;
EGF	–	epidermal growth factor (епідермальний фактор росту);
HB-EGF	–	heparin-binding epidermal growth factor like growth factor (гепарин-зв'язувальний епідермальний фактор росту);
МАРК	–	mitogen activated protein kinases (протеїнкінази, що активуються мітогенами);
NOS	–	nitric oxide synthases (синтаза оксиду азоту);
PKC	–	protein kinase C (протеїнкіназа C);
TGF	–	transforming growth factor (трансформуючий фактор росту).

ЗМІСТ

ВСТУП	5
РОЗДІЛ 1. Загальна молекулярна та функціональна характеристика НВ-EGF людини.....	7
1.1. Структурно-біохімічна характеристика та особливості синтезу НВ- EGF людини.....	7
1.2. Молекулярні механізми дії НВ-EGF людини.....	9
1.3. Функціональне значення НВ-EGF людини в організмі.....	11
1.4. Клінічне та терапевтичне значення НВ-EGF людини.....	18
РОЗДІЛ 2. Матеріали та методи досліджень.....	23
2.1. Матеріали, реактиви та прилади.....	23
2.2. Методи досліджень.....	24
2.2.1. Очищення плазмідної ДНК з бактеріальної культури <i>Escherichia coli</i>	24
2.2.2. Трансформація клітин <i>Escherichia coli</i> BL21 (DE3) Rosetta одержаним конструктором.....	25
2.2.3. Нарощення клітинної біомаси продуцентів рекомбінантного протеїну.....	26
2.2.4. Метал-афінна хроматографія bHis мічених протеїнів.....	27
2.2.5. Визначення концентрації білка у зразках методом Бредфорда.....	28
2.2.6. Диск-електрофорез протеїнів в ПААГ за денатуруючих умов.....	28
2.2.7. Культивування клітинних ліній <i>in vitro</i>	29
2.2.8. Проліферативний МТТ-тест.....	30
2.2.9. Вимірювання впливу УФ-випромінювання на клітинні лінії.....	30
2.2.10 Протокова цитофлуориметрія для оцінки зв'язування протеїнів з поверхневими рецепторами клітин.....	31

2.2.11	Протокова цитофлуориметрія з використанням Анексин V-EGFP та пропідій йодиду.....	32
2.2.12.	Оцінка трансформуючої активності.....	33
2.2.13.	Цитоморфологічний аналіз клітин.....	33
2.3.	Статистичний аналіз отриманих даних.....	34
РОЗДІЛ 3. Результати досліджень та обговорення.....		35
3.1.	Отримання та очищення рекомбінантного НВ-EGF людини.....	35
3.2.	Оцінка трансформуючої активності рекомбінантного НВ-EGF людини.....	38
3.3	Зв'язування рекомбінантного НВ-EGF людини з поверхневими рецепторами.....	42
3.4.	Вплив рекомбінантного НВ-EGF людини на проліферативну активність клітин.....	43
3.5	Оцінка цитопротекторних властивостей рекомбінантного НВ-EGF людини.....	44
3.6	Оцінка адаптогенної дії рекомбінантного НВ-EGF людини.....	48
ВИСНОВКИ.....		55
СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ.....		56

ВСТУП

Рекомбінантні протеїни є важливим об'єктом сучасної експериментальної біології та біомедицини, оскільки дають змогу цілеспрямовано впливати на процеси росту, виживання та відновлення клітин. Особливий інтерес становлять фактори росту, здатні не лише стимулювати проліферацію, а й підвищувати стійкість клітин до дії несприятливих чинників. Одним із таких регуляторних протеїнів є гепарин-зв'язувальний EGF-подібний фактор росту людини (HB-EGF), який належить до родини епідермальних факторів росту та бере участь у регуляції проліферації, міграції, диференціювання і репаративних процесів (Vovk, 2025).

HB-EGF реалізує свою дію через взаємодію з рецепторами EGFR та ErbB4, активуючи сигнальні каскади, пов'язані з підтриманням життєздатності клітин, посиленням метаболічної активності та запуском відновних реакцій. Наявність у його структурі гепарин-зв'язувального домену сприяє утриманню фактора росту в клітинному мікрооточенні та може посилювати локальний біологічний ефект. Завдяки цьому HB-EGF розглядають як перспективний регулятор клітинної відповіді на ушкоджувальні впливи (Komisarenko, 2022).

Одним із поширених стресових чинників для клітини є ультрафіолетове випромінювання, яке індукує окиснювальний стрес, пошкодження ДНК, порушення мембранної цілісності та активацію програмованої загибелі клітин. У зв'язку з цим актуальним є пошук агентів, здатних модулювати стрес-індуковані зміни та підтримувати адаптаційний потенціал клітинної популяції. У цьому аспекті HB-EGF становить значний інтерес, оскільки може поєднувати мітогенну дію з цитопротекторним впливом, сприяючи збереженню функціонального стану клітин (Kim, 2020).

Окреме значення має оцінка потенційної трансформуючої активності HB-EGF, оскільки активація проліферативних сигнальних шляхів потребує контролю з точки зору безпечності біологічної дії рекомбінантного протеїну.

Метою роботи було охарактеризувати адаптогенні властивості рекомбінантного hB-EGF у регуляції стрес-індукованих змін у клітині.

Для досягнення поставленої мети було сформульовано такі завдання:

1. Одержати та очистити рекомбінантний hB-EGF з альтернативними тегами для подальшої порівняльної характеристики.
2. Оцінити мітогенну та цитопротекторну дію рекомбінантного hB-EGF людини.
3. Оцінити трансформуючу активність рекомбінантного hB-EGF людини.
4. Проаналізувати адаптогенні властивості hB-EGF у регуляції стрес-індукованих змін, викликаних опроміненням.

РОЗДІЛ 1

ЗАГАЛЬНА МОЛЕКУЛЯРНА ТА ФУНКЦІОНАЛЬНА ХАРАКТЕРИСТИКА HB-EGF ЛЮДИНИ

1.1. Структурно-біохімічна характеристика та особливості синтезу HB-EGF людини

Гепарин-зв'язувальний епідермальний фактор росту людини (HB-EGF) належить до родини епідермальних факторів росту (EGF), до складу якої також входять трансформуючі фактори росту α (TGF- α), епірегулін (EREG), амфірегулін (AREG), бетацелюлін (BTC), епіген (EPGN), а також представники підродина нейрегулінів (NRG1–NRG4). Спільною структурною ознакою для всіх членів цієї родини є наявність консервативного EGF-подібного домену, який визначає їхню здатність взаємодіяти з рецепторами родини ErbB. Саме цей домен є ключовим елементом, що забезпечує специфічне ліганд-рецепторне зв'язування і, відповідно, подальшу реалізацію біологічної активності цих молекул (Ferreira, 2020).

HB-EGF був вперше ідентифікований на початку 1990-х років у дослідженнях, присвячених аналізу факторів росту, що секретуються імунними клітинами. Зокрема, у 1991 році японський дослідник Хігашіяма та його колеги виділили цей білок із кондиціонованого середовища культур макрофагів, моноцитів, а також клітинної лінії гістіоцитарної лейкемії людини U937. Від моменту відкриття цей білок розглядається як один із ключових представників родини EGF, що поєднує структурні особливості класичних епідермальних факторів росту з додатковими функціональними характеристиками, пов'язаними з його взаємодією з компонентами позаклітинного матриксу (Dronko, 2024).

За своєю природою HB-EGF є одноланцюговим глікопротеїдом. Його молекула містить 86 амінокислотні залишки, стабілізованих трьома дисульфідними містками. Молекулярна маса цього протеїну варіює в межах

від 19 до 27 кДа, що зумовлено різним ступенем глікозилування. У структурі HB-EGF наявний EGF-подібний домен, до складу якого входять шість залишків цистеїну, розташованих у характерній консервативній послідовності C-X₇-C-X₄₋₅-C-X₁₀₋₁₃-C-X-C-X₈-C. Саме ця ділянка відповідає за специфічне зв'язування молекули з рецепторами EGFR та ErbB4, що локалізуються на поверхні клітин. Водночас однією з головних особливостей HB-EGF, яка відрізняє його від інших представників родини EGF, є наявність N-кінцевого гепарин-зв'язувального домену. Завдяки цьому домену HB-EGF здатний міцно взаємодіяти не лише з гепарином, а й з гепарансульфатними протеогліканами клітинної поверхні та компонентами позаклітинного матриксу, що має важливе значення для його локалізації, депонування та функціональної активності в тканинах (Thompson, 1994; Dao, 2018).

Ізоелектрична точка HB-EGF також має видові відмінності: у миші вона становить 9.34, тоді як у людини – 9.70. Такий показник пояснюється великим вмістом основних амінокислот у N-кінцевій ділянці. При цьому важливо враховувати, що незрілий попередник HB-EGF (proHB-EGF) і зріла розчинна форма (sHB-EGF) істотно різняться як за амінокислотним складом, так і за структурною організацією. Попередник HB-EGF складається з 208 амінокислотних залишків і містить кілька функціонально важливих доменів, зокрема гепарин-зв'язувальний, EGF-подібний, юкстамембранний, трансмембранний та цитоплазматичний. На відміну від нього, зріла форма HB-EGF є значно коротшою і включає лише 76-86 амінокислотних залишків. Перехід від мембранозв'язаної форми до розчинної супроводжується суттєвим структурним спрощенням молекули, але при цьому зберігаються ділянки, необхідні для взаємодії з рецепторами і реалізації біологічної дії (Besner, 1998).

HB-EGF кодується однойменним геном *HBEGF*, який локалізований на короткому плечі 5-ї хромосоми, у ділянці 5q23. Будова цього гена включає 6 екзонів і 5 інтронів. У клітині спочатку експресується саме попередник – proHB-EGF, який є трансмембранним протеїном I типу. Він містить EGF-подібний домен і трансмембранний сегмент, що забезпечують його

закріплення в мембрані та подальшу функціональну трансформацію. Під впливом низки стимулів відбувається протеолітичне розщеплення proHB-EGF. До таких стимулів належать активація протеїнкінази С (PKC), зростання внутрішньоклітинної концентрації іонів кальцію, а також дія різних біологічно активних сполук, серед яких 12-О-тетрадеканоїлфорбол-13-ацетат, лізофосфатидна кислота, інсуліноподібний фактор росту-1, естроген та ангіотензин II. У цьому процесі провідну роль відіграють металопротеїнази родини ADAM, насамперед ADAM9, ADAM10, ADAM12 та ADAM17, а також матриксні металопротеїнази. Унаслідок такого протеолітичного процесингу з proHB-EGF утворюються дві основні форми: по-перше, розчинний sHB-EGF з молекулярною масою 14-19 кДа, який здатний взаємодіяти з рецепторами EGFR та ErbB4 і активувати внутрішньоклітинні сигнальні шляхи; по-друге, трансмембранний С-кінцевий фрагмент (Harding, 1996; Fridman, 2007).

1.2. Молекулярні механізми дії HB-EGF людини

HB-EGF відомий як клітинний рецептор дифтерійного токсину. Сам дифтерійний токсин є одноланцюговим білком, що складається з 535 амінокислотних залишків і продукується деякими штамми *Corynebacterium diphtheriae*. Після трипсинізації вихідної молекули формуються дві субодиниці – А та В. У наведеному описі субодиниця А представлена рецепторним, або R-доменом, який відповідає за зв'язування з рецепторами на клітинній мембрані, тоді як субодиниця В містить каталітичний С-домен і транслокаційний Т-домен, необхідний для перенесення каталітичної частини крізь мембрану ендосоми (Choe, 1992).

Після зв'язування токсину з рецептором на плазматичній мембрані комплекс інтерналізується шляхом ендоцитозу. Подальше зниження рН у просвіті ендосоми сприяє вбудовуванню Т-домену в мембрану ендосоми та перенесенню С-домену в цитозоль. Хоча точний механізм транспорту

каталітичної субодиниці через ліпідний бішар досі повністю не з'ясований, відомо, що токсичність дифтерійного токсину обумовлена його здатністю переносити АДФ-рибозну групу з НАД⁺ на дифтамід – модифікований гістидиновий залишок у складі еукаріотичного фактора елонгації трансляції 2. Унаслідок такого АДФ-рибозилування синтез білка в клітині майже повністю блокується, що спричиняє її загибель (Choe, 1992).

Безпосереднім рецептором дифтерійного токсину є саме proHB-EGF. Взаємодія відбувається завдяки тому, що R-домен В-субодиниці дифтерійного токсину зв'язується з EGF-подібним доменом proHB-EGF (Manoilov, 2016). Ця особливість має принципове значення для пояснення видової чутливості до токсину. Ссавців поділяють на чутливі та резистентні види, причому proHB-EGF експресується на поверхні клітин представників обох груп. Однак EGF-подібний домен proHB-EGF у чутливих і резистентних видів відрізняється амінокислотною послідовністю; у резистентних видів встановлено відмінності за десятьма амінокислотними залишками, що вважається головним чинником стійкості до дифтерійного токсину (Prygiel, 2020).

Водночас питання про те, чи здатний дифтерійний токсин зв'язуватися з proHB-EGF на поверхні нечутливих клітин, остаточно не вирішене. Згідно з однією гіпотезою, таке зв'язування взагалі не відбувається.

Інша гіпотеза передбачає, що взаємодія токсину з proHB-EGF на поверхні резистентних клітин усе ж можлива, а комплекси токсин–рецептор інтерналізуються шляхом ендоцитозу, проте механізми резистентності реалізуються вже на внутрішньоклітинному рівні. HB-EGF є не лише фактором росту з багатокомпонентною сигнальною дією, а й молекулою, що визначає сприйнятливність клітини до одного з найвідоміших бактеріальних токсинів (Prygiel, 2020).

1.3. Функціональне значення HB-EGF людини в організмі

HB-EGF, взаємодіючи зі своїми рецепторами, реалізує широкий спектр біологічних ефектів, які мають значення як для нормального функціонування організму, так і для розвитку патологічних станів. Через активацію сигнальних шляхів EGFR, MEK/ERK і PI3K/Akt цей фактор росту бере участь у стимуляції клітинної адгезії, хемотаксису та мітотичної активності, а також у пригніченні апоптозу. Саме тому HB-EGF залучений до багатьох фізіологічних і патологічних процесів, серед яких особливе місце займають загоєння ран, гіперплазія гладеньком'язових клітин, імплантація бластоцисти, онкогенна трансформація та розвиток гіпертрофії серця. Функціональне значення HB-EGF не обмежується локальною дією в окремих тканинах, а охоплює широкий комплекс реакцій, пов'язаних із ростом, відновленням, захистом і перебудовою клітинних систем (Dao, 2018).

Однією з найважливіших ділянок, де виявляється біологічна активність HB-EGF, є слизова оболонка шлунково-кишкового тракту. У цій системі він функціонує як аутокринний фактор росту і відіграє істотну роль у підтриманні епітеліального шару. Оскільки слизова оболонка шлунково-кишкового тракту постійно піддається дії механічних, хімічних і метаболічних чинників, її нормальне функціонування можливе лише за умови безперервного оновлення клітинного складу. Саме тому процеси проліферації, диференціювання та міграції клітин мають тут принципове значення. Встановлено, що HB-EGF переважно синтезується у парієтальних клітинах та G-клітинах шлунка. У цій тканині він бере участь у регуляції проліферації та диференціювання клітин слизової оболонки шлунка за рахунок як аутокринної, так і паракринної секреції (Radulescu, 2011). Дослідження на клітинній лінії слизової оболонки шлунка щура RGM1 показали, що HB-EGF є потужним мітогеном, що дало підстави розглядати його як один із ключових чинників регенерації слизової оболонки шлунка (Dao, 2018). Крім того, експресія HB-EGF помітно посилюється у відповідь на осмотичний та окиснювальний стрес (Stoll, 2012).

У досліджах на клітинних лініях щурів було продемонстровано, що цей фактор росту здатний захищати клітини кишкового тракту від гіпоксичного ушкодження, підтримуючи цілісність цитоскелета та зберігаючи проліферативну активність клітин (Pillai, 1998). Його цитопротекторна дія в умовах гіпоксії пояснюється, зокрема, здатністю підтримувати клітинну цілісність через збереження внутрішньоклітинного рівня АТФ (Nanba, 2004). Додатково в дослідженнях *in vivo* на моделі ізольованого сегмента кишкової ішемії у щура було показано, що ентеральне введення HB-EGF в уражену ділянку може істотно зменшувати небезпеку, пов'язану з розвитком ішемічного ушкодження. У сукупності ці дані свідчать про важливу роль HB-EGF у захисті та відновленні слизової оболонки травного тракту.

Не менш важливою є гепатотропна дія HB-EGF. У печінці він проявляє мітогенний ефект, близький за значенням до дії фактора росту гепатоцитів, HGF. Хоча в самих гепатоцитах рівень HB-EGF є відносно невисоким порівняно з іншими тканинами, це може вказувати на переважно паракринний характер його функціонування в печінковій тканині. У досліджах на щурах після часткової гепатектомії було виявлено істотне зростання рівня HB-EGF, що дозволяє розглядати цей фактор як важливий елемент регенерації печінки. Подальші підтвердження його гепатотрофної ролі були отримані на трансгенних моделях гризунів (Michalopoulos, 2007).

Миші з підвищеною експресією proHB-EGF демонстрували посилену регенерацію печінки після часткової гепатектомії (Kiso, 2003). У регенеруючій печінці таких тварин також відзначали підвищене вивільнення HB-EGF, зростання проліферації гепатоцитів та активацію MAPK. Водночас видалення матричної металопротеїдази частково порушувало регенерацію печінки, оскільки зменшувалося виділення ектодомену proHB-EGF і, відповідно, знижувалася активація EGFR (Zhou, 2015).

Встановлено, що при екстенсивній частковій гепатектомії, коли видаляють дві третини печінки, регуляція HB-EGF виражена сильніше, ніж при обмеженій, коли видаляють одну третину органа. Це має важливе

значення для просування гепатоцитів через стадії клітинного циклу і, таким чином, це є ще одним механізмом гепатотропної дії HB-EGF (Mitchell, 2004). Окремо було досліджено і його гепатопротекторний ефект: після введення токсичного D-галактозаміну здоровим гепатоцитам щура спостерігалось підвищення рівня HB-EGF у період відновлення печінки. Натомість блокування HB-EGF призводило до активного апоптозу гепатоцитів, що визначали за зростанням рівня аланінамінотрансферази – маркера ушкодження печінкових клітин (Zhou, 2015). Це дає підстави вважати, що HB-EGF відіграє важливу роль у відновленні пошкоджених клітин печінки та підтриманні життєздатності печінкової тканини.

Високим рівнем функціональної значущості HB-EGF характеризується і в центральній нервовій системі. Найбільшу експресію цього фактора виявляють у нейронах, астроцитах та дендритних клітинах. У межах головного мозку HB-EGF розподілений досить широко, але найвищий його вміст спостерігається в мозочку та таламусі (Linnerbauer, 2024). При цьому у дорослих особин він продукується в менших кількостях, ніж у молодих, що може свідчити про особливу важливість HB-EGF на ранніх етапах формування і дозрівання нервової системи (Oyagi, 2012). Зазначено, що дія HB-EGF опосередковується через глутаматергічні нейромедіатори, зокрема N-метил-D-аспартат і каїніт. Розмаїття рецепторів до HB-EGF майже на всіх рівнях центральної нервової системи створює передумови для його участі в повноцінному фізіологічному функціонуванні нервової тканини.

Зокрема, EGFR у найбільшій кількості виявляють у неокортексі, гіпокампі та смугастому тілі; ErbB4 – у корі, гіпокампі, мигдалеподібному тілі, повідці, ядрах таламуса та гіпоталамуса, субталамусі, чорній речовині та вентральній ділянці покриву середнього мозку; EGFR, а меншою мірою й ErbB4, також присутні в астроцитах, тоді як ErbB4 локалізується ще й у постсинаптичних пластинках (Oyagi, 2011a). У зв'язку з таким широким спектром ефектів можна припустити, що саме HB-EGF виступає основним фізіологічним лігандом для рецепторів родини EGF у центральній нервовій

системі, оскільки інші представники цієї родини там експресуються меншою мірою. Локалізація самого HB-EGF і його рецепторів у різних структурах мозку свідчить про те, що його сигналінг виконує роль важливого трофічного механізму, який впливає на розвиток нервової системи та формування вищої нервової діяльності (Oyagi, 2012). Додатково встановлено, що після ішемії експресія HB-EGF у корі головного мозку зростає, і цей фактор може бути лімітуючим чинником розвитку патологічного процесу (Oyagi, 2011b).

HB-EGF відіграє роль і у функціонуванні нирок. Найвищий рівень його експресії у видільній системі спостерігається у зовнішньому мозковому шарі нирки та в епітеліальних клітинах дистальних звивистих каналців. У меншій кількості він представлений у проксимальніших сегментах ниркових каналців, а також у гладеньких м'язах судин нирки, що вже само по собі вказує на ймовірну участь цього фактора в регуляції функціонального стану ниркової тканини (Zeng, 2016).

Інгібування дії HB-EGF шляхом блокування його зв'язування з EGF-рецепторами за допомогою міРНК різко знижує проліферативну активність проксимальних каналців нирок (Johnson, 2015). Крім того, після ниркової ішемії або реперфузійного ушкодження експресія різних форм HB-EGF істотно зростає, особливо в тих клітинах, які і в нормальних умовах мають відносно високий рівень цього фактора росту. HB-EGF може діяти як автокринний або паракринний фактор росту, який бере участь у проліферації епітеліальних клітин каналців у період регенерації нирок (Hashimoto, 1994).

Суттєве значення має HB-EGF і для процесів регенерації легень. Пригнічення його активності в легневих клітинах призводить до їхнього руйнування та порушення відновлення тканини. TGF- β , який у великій кількості присутній у нормальному епітелії дихальних шляхів, також здатний активувати EGFR і стимулювати регенерацію епітеліальних клітин дихальних шляхів через механізм, залежний від HB-EGF та TGF- α (Ito, 2011).

Відомо, що в легневих фібробластах лізофосфатидна кислота підвищує експресію HB-EGF та амфірегуліну (Shiomi, 2011). Подальша обробка

альвеолярних епітеліальних клітин кондиціонованим середовищем легеневих фіброblastів, попередньо стимульованих лізофосфатидною кислотою, призводить до значного посилення активації EGFR (Allahverdian, 2008). Це свідчить про наявність паракринної взаємодії між фіброblastами та альвеолярними епітеліальними клітинами людини, яка залежить від секретованих лігандів EGFR. Крім того, вивільнення proHB-EGF сприяє секреції IL-8 бронхіальними епітеліальними клітинами, а IL-8, у свою чергу, є потужним хемоатрактантом для нейтрофілів (Parnia, 2014).

HB-EGF входить до складу різних механізмів захисту, які підтримують легеневий гомеостаз і особливо важливі в умовах впливу токсичних чинників. У моделі компенсаторного росту легень після лівобічної пневмонектомії HB-EGF виступав як ендокринний фактор, що вивільнявся після активації рецептора VEGF (Ding, 2011). Це сприяло відновленню альвеолярних вузлів під час компенсаторного росту легень, поєднуючи процеси ангиогенезу з проліферацією епітеліальних клітин у перебігу регенерації альвеолярних одиниць (Dao, 2018).

В іншому дослідженні було показано, що еластаза, яка відіграє важливу роль у розвитку емфіземи, взаємодіє з основним фактором росту фіброblastів FGF-2 і сприяє вивільненню розчинного HB-EGF. Поєднана дія HB-EGF та FGF-2 знижувала експресію еластину, що може підтримувати подальшу проліферацію клітин або у відповідь на руйнування альвеол. У сукупності ці дані підтверджують мітогенні властивості HB-EGF та його значення як одного з ключових чинників, що стимулюють регенерацію альвеолярної тканини після ушкодження паренхіми легень (Liu, 2003).

Важливою функціональною сферою дії HB-EGF є також регуляція міграції кератиноцитів під час загоєння ран. У процесі відновлення шкіри кератиноцити мають центральне значення, оскільки вони не лише репопулюють епідерміс, а й самі виступають важливим джерелом факторів росту, зокрема представників родини EGF, до якої належить і HB-EGF. Саме його аутокринні властивості забезпечують ефективну, хоча й відносно

повільну, проліферацію та міграцію кератиноцитів *in vitro* (Nishi, 2003). Зріла форма HB-EGF стимулює тимчасову активацію EGFR, і ця активність є необхідною умовою для міграції кератиноцитів. Подібно до інших членів родини EGF, HB-EGF також стимулює їхню проліферацію (Stoll, 2012). Показово, що деякі інгібітори металопротеїназ, зокрема OSU8-1 та KB-R7785, є відносно специфічними до proHB-EGF. Вони блокують вивільнення HB-EGF і пригнічують функціонування EGFR, що зумовлює зниження міграції кератиноцитів *in vitro* (Hashimoto, 1994).

В експерименті на мишах нанесення OSU8-1 на штучно створені рани призводило до уповільнення загоєння тканини та порушення міграції кератиноцитів. Коли ж на ці ж ділянки додатково наносили розчинний рекомбінантний HB-EGF, дія OSU8-1 нейтралізувалася. Це дало підстави зробити висновок, що HB-EGF є критично важливим фактором для міграції кератиноцитів і для нормального процесу загоєння ран (Boonstra, 1995).

Окремого розгляду потребує роль HB-EGF у розвитку злоякісних пухлин. Його експресія виявляється в багатьох тканинах, зокрема в легенях, серці, мозку та скелетній мускулатурі. Разом з тим при ряді онкологічних захворювань, таких як гепатоцелюлярна карцинома, рак підшлункової залози, шлунка та молочної залози, рівень HB-EGF значно зростає порівняно з нормою, що вказує на його ймовірну участь у пухлинній трансформації та прогресії новоутворень. Це підтверджується дослідженнями на щурах із гепатоцелюлярною карциномою, у яких було виявлено суттєве збільшення кількості HB-EGF в організмі порівняно зі здоровими тваринами.

У щурів з онкологічними захворюваннями спостерігався підвищений рівень асцитної рідини в черевній порожнині. Водночас антитіла, що блокують HB-EGF, пригнічували ріст деяких пухлин, зокрема гліобластоми та множинної мієломи, що свідчить про наявність аутокринного механізму підтримання пухлинного росту. Було з'ясовано, що введення HB-EGF у нормальні клітини може спричинити онкогенну трансформацію (Fang, 2001).

Відповідно, у певних умовах HB-EGF може виступати не лише фізіологічним регулятором росту, а й чинником, який сприяє канцерогенезу.

Ще однією важливою біологічною функцією HB-EGF є його участь у прикріпленні бластоцисти та ранньому розвитку ембріона. Встановлено, що клітини люмінального епітелію матки починають експресувати proHB-EGF за 6–7 год до прикріплення до них бластоцисти. У період вагітності HB-EGF уперше секретується саме епітеліальними клітинами матки, до яких упродовж наступних чотирьох днів має прикріпитися бластоциста (Das, 1994). Така динаміка подій свідчить про те, що для бластоцисти HB-EGF виконує функцію фактора адгезії. При цьому цей процес не можна вважати суто гормонозалежним, оскільки в псевдовагітних матках мишей, де гормональне середовище є дуже близьким до такого за нормальної фізіологічної вагітності, експресія HB-EGF була відсутня (Raab, 1996).

Бластоцисти мишей, позбавлені EGFR, зберігали здатність взаємодіяти між собою та прикріплюватися до епітелію, що свідчить про участь у цьому процесі рецепторів HB-EGF, але не самого EGFR. Серед можливих рецепторів, відповідальних за прикріплення бластоцисти, розглядають ErbB4 або HSPG. Зріла форма HB-EGF також сприяє дозріванню бластоцист у різних видів, включаючи мишей, щурів і людину (Lim, 2009).

Локальне введення HB-EGF до просвіту матки здатне імітувати ті локальні реакції, які зазвичай виникають у відповідь на появу бластоцисти, зокрема підвищення локальної судинної проникності, децидуалізацію та експресію кісткового морфогенетичного протеїну в місці введення HB-EGF. Показово, що жоден інший представник родини EGF, окрім HB-EGF, не викликав подібних ефектів. Ці дані свідчать про роль HB-EGF у процесах прикріплення бластоцисти та раннього ембріонального розвитку (Paria, 1999).

HB-EGF є багатофункціональним фактором росту, біологічна роль якого поширюється на широкий спектр процесів – від підтримання цілісності слизових оболонок і регенерації внутрішніх органів до регуляції функцій нервової системи, загоєння ран, ембріонального розвитку та участі в

онкогенезі. Така багатогранність його ефектів зумовлена як різноманіттям тканин, у яких він експресується, так і здатністю активувати кілька сигнальних шляхів одночасно, функціонуючи як автокринний, паракринний, а подекуди й ендокринний регулятор клітинних процесів.

1.4. Клінічне та терапевтичне значення HB-EGF людини

HB-EGF має значний потенціал як терапевтична мішень, оскільки цей фактор росту залучений до регуляції великої кількості фізіологічних і патологічних процесів. Його унікальні структурні особливості та висока біологічна активність визначають участь у регенерації тканин, контролі проліферації та виживання клітин, а також у розвитку запальних і пухлинних реакцій. Саме тому терапевтичне значення HB-EGF є двоїстим. З одного боку, він може виступати як перспективний агент для стимуляції репаративних процесів, а з іншого – як молекулярна мішень, інгібування якої здатне мати клінічний ефект у разі злоякісних новоутворень та окремих захворювань шлунково-кишкового тракту. Особливої уваги HB-EGF набуває саме в онкології та гастроентерології, де його дія може бути або патогенетично значущою, або потенційно корисною з терапевтичної точки зору (Adam, 2009).

Одним із головних напрямів, у межах якого розглядають терапевтичне значення HB-EGF, є лікування онкологічних захворювань. Оскільки цей фактор росту бере участь у багатьох етапах розвитку пухлини, її прогресування та метастазування, були запропоновані різні підходи до терапевтичного націлювання на HB-EGF. До таких стратегій відносять запобігання зв'язуванню самого ліганду з EGFR, інгібування протеолітичного розщеплення proHB-EGF і, відповідно, блокування подальшого вивільнення ектодомену та С-кінцевих фрагментів, а також використання proHB-EGF як рецептора для дифтерійного токсину. Саме тому розгляд механізмів

інгібування HB-EGF та оцінка їхнього потенціалу для клінічного застосування становлять значний науковий і практичний інтерес (Adam, 2009).

У тих випадках, коли в пухлинній тканині спостерігається надмірна експресія HB-EGF, деякі його ефекти можуть бути заблоковані за допомогою функціонально блокуючих анти-EGFR антитіл або низькомолекулярних інгібіторів внутрішнього кіназного домену рецептора. Окремий інтерес викликав підхід, що ґрунтується на подібності proHB-EGF до рецептора дифтерійного токсину в клітинах людини. У дослідженнях клітини обробляли нетоксичним мутантом дифтерійного токсину, CRM197. Його нетоксичність пояснюється наявністю точкової мутації G52E, яка знижує здатність молекули здійснювати АДФ-рибозилування фактора елонгації та, блокує властиву природному токсину здатність інгібувати синтез білка (Mekada, 1985). Проте, незважаючи на відсутність класичної токсичності дифтерійного токсину, CRM197 зберігає виражений інгібуючий вплив на ріст клітин, зв'язуючись з EGF-подібним доменом клітинної поверхні (Kageyama, 2007).

Експериментальні дослідження показали, що CRM197 сам по собі здатен індукувати апоптоз, пригнічувати онкогенні властивості клітин, зокрема їхню міграцію та інвазію *in vitro*, а також зменшувати ріст пухлини, стимулювати апоптоз і пригнічувати ангіогенез у ксенотрансплантатів у мишей (Yagi, 2009). Крім того, посилення протипухлинної активності CRM197 спостерігали при його поєднанні зі стандартними хіміотерапевтичними препаратами, наприклад паклітакселом. Хоча результати такої комбінованої хіміотерапії поки не можна вважати остаточно підтвердженими, важливо, що сам вплив хіміотерапевтичних агентів на клітини здатний підвищувати рівень HB-EGF. З одного боку, це може сприяти формуванню стійкості до лікування, але з іншого – за умови правильного планування схеми введення препаратів це явище потенційно може бути використане для сенсibilізації пухлинних клітин до агентів, спрямованих на HB-EGF (Yagi, 2009).

З урахуванням описаної біоактивності CRM197 його призначали пацієнтам із прогресуючими злоякісними новоутвореннями, резистентними до

стандартної терапії (Yagi, 2009). Водночас одним із потенційних обмежень такого підходу є те, що значна частина людей у популяції імунізована проти дифтерії, а тому може мати певну резистентність до CRM197, який вводиться системно. Хоча в окремих дослідженнях ефект CRM197 був незначним, новіші дані, що свідчать про підвищення його біоактивності в комбінації зі звичайними хіміотерапевтичними агентами, дають підстави припускати, що цей білок може розглядатися як потенційний протираковий засіб (Sanui, 2010).

Ще одним важливим напрямом терапевтичного втручання є пригнічення протеолітичного розщеплення мембранозв'язаного ргоHB-EGF, оскільки саме цей процес є головною контрольною точкою регуляції біоактивності HB-EGF. Саме тому блокування «шеддингу» ргоHB-EGF розглядається як спосіб пригнічення залежної від HB-EGF регуляції поведінки пухлинних клітин. Було описано селективні інгібітори, здатні запобігати виділенню лігандів ErbB *in vitro* і водночас демонструвати виражений протипухлинний ефект у низці експериментальних систем, включаючи пригнічення шляхів виживання, а також зменшення росту й життєздатності ксенотрансплантатів. Хоча такі інгібітори впливають не лише на HB-EGF, а й на вивільнення інших EGF-подібних лігандів, отримані результати свідчать про перспективність комбінованого пригнічення секреції лігандів і активації ErbB-рецепторів за допомогою малих молекул (Fridman, 2007).

Запобігання вивільненню розчинної форми HB-EGF, фармакологічне інгібування активності металопротеїназ MMP/ADAM за допомогою KB-R7785 також пригнічувало утворення та ядерну транслокацію С-кінцевого фрагмента HB-EGF (Shimura, 2007). Наслідком цього були зупинка росту клітин, індукція апоптозу та зниження експресії генів, пов'язаних із проліферацією. Це ще раз підкреслює перспективність такого підходу в протипухлинній терапії.

Іншим великим напрямом терапевтичного значення HB-EGF є його потенційне використання при захворюваннях шлунково-кишкового тракту. Терапевтична роль цього фактора росту вивчалася на різних моделях кишкового ушкодження, зокрема при некротичному ентероколіті, ішемічно-

реперфузійному ушкодженні кишківника та геморагічному шоці. У таких дослідженнях було показано, що HB-EGF може діяти як ефективний мітоген, фактор, що стимулює відновлення тканин, клітинний трофічний агент, антиапоптотичний білок і вазодилататор, впливаючи на різні типи клітин у кишківнику (Feng, 2005).

Особливу увагу в цьому контексті привертає некротичний ентероколіт, який є найпоширенішим невідкладним шлунково-кишковим станом у недоношених новонароджених, особливо у дітей, які важать 1500 г (Lee, 2008). Смертність при цьому захворюванні коливається в межах 20-50 %, а його поширеність зростає настільки, що воно може стати однією з провідних причин смерті серед недоношених новонароджених (Caplan, 2001). Вважають, що його розвитку сприяють порушення моторики шлунково-кишкового тракту, дефекти кишкового бар'єра, знижена здатність до травлення, недостатня регуляція кровообігу, надмірний ріст кишкових мікроорганізмів і незрілість імунного захисту (Harding, 1996).

У пацієнтів, які перенесли некротичний ентероколіт, нерідко в подальшому розвиваються порушення моторики, мальабсорбція, недоїдання, стриктури кишківника та синдром короткої кишки (Chen, 2012). На цьому тлі HB-EGF розглядають як потенційний захисний і відновний чинник.

Було показано, що HB-EGF присутній в амніотичній рідині та грудному молоці людини, забезпечуючи постійний вплив на розвиток кишківника плода і новонародженого (Michalsky, 2022). При аноксії у дитини в кишкових епітеліальних клітинах посилюється експресія HB-EGF, а ішемічно-реперфузійне ушкодження кишківника *in vivo* також супроводжується підвищенням його експресії (Xia, 2003). Відповідно, гіперекспресія HB-EGF розглядається як частина ендogenous захисного механізму, спрямованого на зменшення ушкодження кишкової тканини. Дослідження підтвердили, що HB-EGF бере участь у підтриманні бар'єрної функції кишківника, стимуляції клітинної проліферації та міграції (Feng, 2007), зниженні апоптозу ентероцитів і стовбурових клітин (Blikslager, 2007), збереженні мікроциркуляторного

кровотоку, регуляції імунної функції кишківника, а також у відновленні перистальтики після ушкодження (Su, 2013).

HB-EGF може регулювати основні ізоформи синтази оксиду азоту: індуцибельну NOS, реалізуючи протизапальну дію; ендотеліальну NOS, сприяючи вазодилатації та ангіогенезу; а також нейрональну NOS, стимулюючи перистальтичну активність кишківника (Nankervis, 2001). Його терапевтичний потенціал у гастроентерології зумовлений не лише мітогенними властивостями, а й здатністю комплексно підтримувати структурну і функціональну цілісність кишкової стінки.

З огляду на наведені експериментальні дані, існують вагомі підстави вважати, що в майбутньому можуть бути розроблені ретельно сплановані клінічні дослідження за участю пацієнтів із різними типами кишкових ушкоджень, у тому числі з некротичним ентероколітом, для оцінки клінічної ефективності терапії на основі HB-EGF.

РОЗДІЛ 2

МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕНЬ

2.1. Матеріали, реактиви та прилади

Для проведення експериментальної роботи були використані такі реактиви: середовище для бактерій LB («Sigma», США), бактеріологічні петлі, чашки Петрі, агар, агароза («Sigma», США), Co^{2+} -NTA («Qiagen», Німеччина), ізопропіл- β -D-1-тіогалактопіранозид (ІПТГ) («Thermo Fisher Scientific», США), персульфат амонію, тетраметилетилендіамін (ТЕМЕД), акриламід, N, N'-метилен-біс-акриламід, β -меркаптоетанол, бичачий сироватковий альбумін (БСА), трицин («Sigma-Aldrich», США), сечовина, бромфеноловий синій, кумасі блакитний G-250, імідазол, гліцерин, етиловий спирт, трис(гідроксиметил)амінометан (Tris) («Sigma-Aldrich», США), оцтова кислота, диметилсульфоксид (ДМСО), етилендіамінтетраоцтова кислота (ЕДТА), HCl, H₂SO₄, NaOH, CaCl₂, KCl, NaCl, KH₂PO₄, Na₂CO₃, NaHCO₃, MgSO₄ («Міранда-С», Україна), хлорамфенікол, ампіцилін, канаміцин, глюкоза («Київмедпрепарат», Україна), Triton X-100 («Sigma-Aldrich», США), Tween 20, маркери для електрофорезу протеїнів, коктейль інгібіторів протеїназ («Thermo Fisher Scientific», США), набір для виділення ДНК «GeneJET Plasmid Miniprep Kit» («Thermo Fisher Scientific», США), фетальна бичача сироватка (ФБС), культуральні флакони та чашки для культури тканин («Greiner Bio One», Німеччина), пеніцилін, стрептоміцин, амфотеріцин, 3-(4,5-діметилтіазоліл-2)-2,5-діфенілтетразоліум бромід (МТТ), середовище DMEM, одноразовий лабораторний посуд («Delta Lab», Іспанія) та інші реактиви кваліфікації х.ч. або ч.д.а.

Було використане наступне обладнання: аналітичні ваги «WAA 210/C/1» («Salex», Данія), камера для вертикального електрофорезу («Bio-Rad», США), мікроцентрифуга «Eppendorf minispin», мультилунковий спектрофотометр

«µQuant ELx800» («BioTek», США), орбітальний шейкер-термостат «ES-20», охолоджувач «SC-2M» та нагрівач зразків «TDD-120» («Biosan», Латвія), прилад для електропорації «Electroporator 2510» («Eppendorf», Німеччина), протоковий цитофлуориметр «DxFLEX» («Beckman Coulter», США), спектрофлуориметр «QuantaMaster 400» («Photon Technology International», Канада), спектрофотометр «GeneQuantoPro» («Amersham Biosciences», США), транслюмінатор «Vilber Lourmat TFX-20.LM» («Cedex», Франція), ультразвуковий дезінтегратор «Labsonic M» («Sartorius», Німеччина), холодинно-опалювальна установка (рефрижератор) («Joan», Франція), CO₂-інкубатор, рН-метр «CyberScan 510» («Eutech Instruments», Сінгапур), шафа-ламінар («ESCO Class II BSC», Сінгапур).

2.2. Методи досліджень

2.2.1. Очищення плазмідної ДНК з бактеріальної культури *Escherichia coli*

Під час виділення плазмідної ДНК рЕТ32(a)-*hb-egf* із клітин *E. coli* DH10B набір «GeneJET Plasmid Miniprep Kit» («Thermo Fisher Scientific», США) використовували відповідно інструкції виробника. Попередньо бактеріальну культуру вирощували протягом ночі у середовищі LB, що містило ампіцилін у кінцевій концентрації 1 мкг/мл, при температурі 37°C.

На першому етапі осад із 1,5 мл добової культури *E. coli* DH10B ресуспендували в 250 мкл буферного розчину для ресуспендування бактеріальних клітин («Resuspension Solution») до повного розчинення. Потім додали 250 мкл буферного розчину для лізису клітин («Lysis Solution») і ресуспендували. Далі до суміші додали 350 мкл буферного розчину для нейтралізації («Neutralization Solution») і також ретельно ресуспендували.

Зразки центрифугували протягом 5 хв для осадження залишків клітин та хромосомної ДНК. Надосадову рідину перенесли до спеціальних колонок «GeneJET». Потім проводили центрифугування протягом 1 хв при 13400 об/хв.

Після цього двічі до «GeneJET Spin Columns» додавали 500 мкл буферного розчину для відмивання з етанолом («Wash Solution») та центрифугували при 13400 об/хв протягом 60 с. Колонки перемістили у нові пробірки, де до них додали 50 мкл буферного розчину для елюції – «Elution Buffer» (10 мМ Трис-НСl, рН 8.5) та інкубували при кімнатній температурі протягом 1-2 хв. Після інкубування колонки центрифугували при 13400 об/хв протягом 1 хв та збирали елюат – це очищена плазмідна ДНК, готова для подальших досліджень або зберігання.

2.2.2 Трансформація клітин *Escherichia coli* BL21 (DE3) Rosetta одержаним конструктором

Трансформацію клітин *E. coli* BL21 (DE3) Rosetta проводили методом електропорації з використанням приладу «Electroporator 2510». Для цього у стерильну мікропробірку вносили 2 мкл очищеної плазмідної ДНК рЕТ32(a)-*hb-egf* та 40 мкл електрокомпетентних бактеріальних клітин, після чого суміш обережно перемішували до отримання однорідної суспензії. Підготовлену клітинно-ДНК суміш переносили у стерильну електропораційну кювету та піддавали дії електричного імпульсу при напрузі 2200 В і тривалості 4,5 мкс.

Одразу після електропорації до кювети додавали відновлювальне середовище, що складалося з 1 мл середовища LB, 4 мкл MgSO₄ та 9 мкл глюкози. Отриману суспензію інкубували при 37°C протягом 1 год для відновлення життєздатності клітин і стабілізації внутрішньоклітинних процесів.

Для підтвердження успішності трансформації клітини висівали на тверде поживне середовище LB з агаром, що містило відповідний селективний

антибіотик. У стерильних умовах на поверхню чашок Петрі наносили 10 мкл та 100 мкл трансформованої суспензії та рівномірно розподіляли за допомогою скляного шпателя. Чашки інкубували при 37°C до появи колоній. Наявність колоній на селективному середовищі свідчила про успішну трансформацію клітин та інтеграцію плазмідної ДНК.

2.2.3. Нарощення клітинної біомаси продуцентів рекомбінантного протеїну

Для подальших експериментальних досліджень використовували два штами продуцентів *E. coli*:

1. *E. coli* BL21 Star (DE3), трансформований конструкцією *pET32a-6His-TRX-sHB-EGF*;
2. *E. coli* Rosetta (DE3), що містив конструкцію *pET28b-sHB-EGF-6His*;

Першим етапом було нарощення клітинної біомаси (нічна культура). Для цього культуру *E. coli* переносили в культуральне середовище в стерильних умовах. Об'єм середовища LB – 15 мл. Клони-продуценти *E. coli* вносилися в об'ємі 40 мкл. До середовища додавали селективний антибіотик залежно від типу плазмід, для *pET32* – ампіцилін, для *pET24* – канаміцин, в кінцевій концентрації 1 мкг/мл. Далі середовище із продуцентом ставили на шейкер-термостат, де клітинна маса нарощувалась при 37°C на 240 об/хв протягом ночі (18 год).

Наступним етапом було подальше нарощення клітинної біомаси в більшому об'ємі із наступним стимулюванням експресії цільового гена рекомбінантного протеїну. Для цього нарощену нічну культуру в об'ємі 7 мл вносили у 200 мл середовищі LB, з додаванням відповідного селективного антибіотика (ампіциліна або канаміцину). Нарощення культури відбувалося при активній аерації на шейкері, протягом 2-3 год при 37°C 240 об/хв.

Для стимуляції експресії генів у 200 мл культурального середовища вносили ПТГ в кінцевій концентрації 1 мМ, з подальшою активною аерацією на шейкері протягом 3-4 год при 30°C та 250 об/хв. Культуру клітин переносили в пробірки та центрифугували 20 хв при 3600 об/хв при температурі 4°C. Супернатант зливали, а клітинний осад заморожували та зберігали при температурі -80°C або відразу використовували для виділення рекомбінантного ростового фактора.

2.2.4. Метал-афінна хроматографія 6His-мічених протеїнів

Для очищення та виділення НВ-EGF використали метал-афінну хроматографію на сорбенті Co^{2+} -NTA агарозі. Цей сорбент використовують для виділення протеїнів, що мають His-tag на N- або С-кінці молекули. Осад замороженої бактеріальної культури ресупендували в 1 мл буферного розчину для відмивання (50 мМ Na_2HPO_4 , 0,3 М NaCl , рН 8.0), який містив 10 мМ імідазол. До зразків вносили лізоцим з курячих яєць у кінцевій концентрації 0,1 мг/мл та інгібітор протеаз, що не містив ЕДТА, у розрахунку 10 мкл на 1 мл зразка та інкубували при 37°C протягом 10 хв. Після чого лізат переносили в мікропробірки та обробляли ультразвуком за допомогою ультразвукового дезінтегратора «Labsonic M», використовуючи 60 пульсів високої інтенсивності, весь процес відбувався при температурі 4°C. Наступним етапом було центрифугування мікропробірок протягом 20 хв при 13400 об/хв. У відібраний супернатант внесли ДНКазу згідно інструкції виробника та інкубували при 37°C протягом 30 хв.

Отриманий бактеріальний лізат вносили на попередньо врівноважену колонку 15 об'ємами буферного розчину для відмивання з 10 мМ імідазолом. Після нанесення проби колонку промивали 25-30 об'ємами того ж буферного розчину. Елюція цільового білка проводили за допомогою буферного розчину для відмивання, але з концентрацією імідазолу до 250 мМ. Отриманий елюат

діалізували проти 1 л забуференого фізіологічного розчину (ЗФР) (0,8 % NaCl, 0,02 % KCl, 0,144 % Na₂HPO₄, 0,024 % KH₂PO₄, рН 7.4) при температурі 4°C протягом 12 год. Носій колонки промивали водою та консервували у 20 % етиловому спирті до подальшого використання.

2.2.5. Визначення концентрації білка у зразках методом Бредфорда

У 96-лунковий планшет вносили стандарти БСА у концентрації 2,0 мг/мл; 1,0 мг/мл; 0,75 мг/мл; 0,5 мг/мл; 0,25 мг/мл та 0,125 мг/мл та елюат, що містив протеїн у невідомій концентрації в об'ємі 5 мкл на лунку. Далі до кожної лунки додавали 245 мкл реактиву Бредфорда, що був приготований шляхом розчинення 100 мг кумасі блакитного G-250 у 50 мл 96 % етанолу та додавання 100 мл 85 % ортофосфорної кислоти та 850 мл дистильованої води та інкубували планшет у темряві протягом 5 хв. Після інкубації визначали оптичну щільність при довжині хв 595 нм за мультилунковий спектрофотометр «μQuant ELx800» («ВіоТек», США). Концентрацію білків у зразках розраховували за калібрувальним графіком.

2.2.6. Диск-електрофорез протеїнів в ПААГ за денатуруючих умов

Оцінку чистоти та молекулярної маси отриманого рекомбінантного протеїну проводили методом електрофорезу в 10 % поліакриламідному гелі в присутності додецилсульфату натрію (ДСН-ПААГ). Розділення здійснювали у вертикальній електрофоретичній камері («Віо-Rad», США) протягом 90 хв при напрузі 120 В.

Приготування гелю проводили у два етапи. У першу чергу готували розділяючий гель, до складу якого входили акриламід, N,N'-метилен-біс-акриламід, TEMED, дистильованої води, гелевого буферного розчину,

гліцину. Після полімеризації розділяючого шару заливали концентруючий гель, що містив N,N'-метилен-біс-акриламід, акриламід, TEMED, дистильована вода, гелевий буферний розчин. Зразки для електрофорезу попередньо ресуспендували з буферним розчином для зразків, що містив 8 М сечовину, 4 % ДСН, 5 % β -меркаптоетанол та бромфеноловий синій. Після чого зразки інкубували при 85°C протягом 5 хв із використанням нагрівача зразків TDD-120 («Biosan», Латвія) для денатурації білків.

Після завершення електрофорезу гель кип'ятили для видалення ДСН, а потім фарбували розчином кумасі блакитного G-250 протягом 20 хв. Для визначення молекулярної маси досліджуваних білків використовували стандартні білкові маркери.

2.2.7. Культивування клітинних ліній *in vitro*

У якості модельних систем для оцінки проліферативної активності та адаптогенної дії рекомбінантного HB-EGF використовувались такі клітинні лінії: 3T3 (ембріональні фібробласти миші), L929 (мишачі фібробласти підшкірної сполучної тканини), A431 (клітини епідермоїдної карциноми людини), Vero (епітеліальні клітини нирки африканської зеленої мавпи) та HEK293 (ембріональні клітини нирки людини).

Клітини культивували у поживному середовищі RPMI-1640, доповненому 10 % фетальною бичачою сироваткою (ФБС) та антибіотиками: пеніциліном (10000 ОД/л), стрептоміцином (100 мг/л) і амфотерицином (250 мкг/л). Культивування проводили в CO₂-інкубаторі за температури 37°C та при 5 % CO₂. Пересів клітин здійснювали при досягненні 80-90 % конфлюентності. Для відокремлення клітин використовували трипсин, дію якого інгібували додаванням середовища RPMI-1640, що містило 10 % ФБС.

2.2.8. Проліферативний МТТ-тест

У 96-лунковий культуральний планшет вносили по 100 мкл клітинної суспензії, що містила $2,5 \times 10^4$ клітин у середовищі RPMI-1640 з феноловим червоним, доповненому 10 % ФБС. Клітини інкубували в CO₂-інкубаторі при 37°C та 5 % CO₂ протягом 24 год для адгезії.

Після інкубації культуральне середовище видаляли, а клітини за потреби двічі промивали ЗФР. У лунки додавали по 100 мкл середовища RPMI-1640, що містило різні концентрації рекомбінантного НВ-EGF, і інкубували клітини протягом 24 год за стандартних умов (37°C, 5 % CO₂). Наступним кроком, аспірували середовище з протеїном та вносили МТТ-реагент у кінцевій концентрації 0,5 мг/мл. Інкубацію проводили протягом 4 год при 37°C для утворення кристалів формазану.

Після інкубації МТТ-реагент видаляли, а до кожної лунки додавали по 100 мкл розчину, що містив 10 % ДСН та 0,04 М НСІ у ДМСО. Вміст лунок перемішували на шейкер-термостаті при 37°C і 150 об/хв протягом 20 хв до повного розчинення кристалів формазану. Оптичну густину вимірювали при довжині хвилі 545 нм за допомогою мультилунковий спектрофотометра «μQuant ELx800» («BioTek», США).

2.2.9. Вимірювання впливу УФ-випромінювання на клітинні лінії

Для дослідження впливу УФ променів та цитопротекторної дії рекомбінантного НВ-EGF використовували модифікований протокол МТТ-тесту, під час якого клітини піддавали впливу ультрафіолетового випромінювання з довжиною хвилі 365 нм протягом 30 с. Опромінення здійснювали на етапі між промиванням клітин та додаванням протеїну. Для цього планшет із клітинами розміщували на поверхні транслюмінатора, де відбувалося безпосереднє опромінення моношару клітин.

Відповідно до інформації, що надав виробник, інтенсивність опромінення на довжині хвилі 365 нм становило 4,4 мВт/см². Розрахунок загальної енергії опромінення проводили за формулою:

$$E = I \times t, \quad (2.1)$$

де E – енергія опромінення, мДж/см²;

I – інтенсивність опромінення, мВт/см²;

t – час опромінення, с.

Таким чином, клітини отримували енергетичне навантаження 132 мДж/см² при довжині хвилі 365 нм.

Як контроль ефективності дії рекомбінантного протеїну використовували окремі планшети, на які вносили аналогічні концентрації білків і висівали аналогічну кількість клітин, однак без впливу ультрафіолетового опромінення.

2.2.10. Протокова цитофлуориметрія для оцінки зв'язування протеїнів з поверхневими рецепторами клітин

Для визначення здатності рекомбінантного HB-EGF зв'язуватися з поверхневими рецепторами використовували клітинну лінію *A431*. Для використали 5×10^5 клітин, які попередньо вирощували до конфлюентного стану. Клітини знімали з поверхні культурального посуду за допомогою 30 мМ ЕДТА у ЗФР та інкубували протягом 15 хв при 37°C.

Після цього клітини двічі промивали, осаджували центрифугуванням і ресуспендували у ЗФР, що містив 1 % БСА та 0,1 % NaN₃. Далі проводили інкубацію клітин при 4°C протягом 30 хв у присутності 10 мкг контрольного протеїну mCherry або рекомбінантного mCherry-HB-EGF. Після інкубації клітини двічі відмивали та ресуспендували в аналогічному буфері. Реєстрацію

інтенсивності флуоресценції проводили на протоковому цитофлуориметрі «DxFLEX» («Beckman Coulter», США) з використанням каналу ECD-A.

2.2.11. Протокова цитофлуориметрія з використанням Аннексин V-EGFP та пропідій йодиду

Для оцінки шляху загибелі клітин їх висівали у 6-лункові культуральні планшети з розрахунку 5×10^5 клітин на лунку в середовищі RPMI-1640 з додаванням 10 % ФБС. Через 24 год клітини опромінювали ультрафіолетом за схемою, аналогічною тій, що застосовували у модифікованому МТТ-тесті. Після цього вносили культуральне середовище, що містило HB-EGF у різних концентраціях та інкубували протягом наступних 24 год при 37°C та 5 % CO_2 .

Після інкубації клітини знімали з поверхні культурального посуду 30мМ ЕДТА, переносили в мікропробірки та осаджували центрифугуванням при 13400 об/хв упродовж 5 хв. Осад двічі відмивали ЗФР із повторним центрифугуванням за аналогічних умов. Отриманий клітинний осад ресуспендували з ЗФР, що містив 1 % БСА, 0,1 % NaN_3 та інкубували 25 хв у присутності 50 мкг/мл рекомбінантного Annexin V-EGFP при температурі 4°C . Безпосередньо перед аналізом до проб додавали пропідій йодид зі стокового розчину, концентрацією 0,5 мкг/мл. Флуоресценцію реєстрували на протоковому цитофлуориметрі «DxFLEX» («Beckman Coulter», США), використовуючи канал FITC-A для Annexin V-EGFP і ECD-A для пропідій йодиду.

2.2.12. Оцінка трансформуючої активності

Для визначення трансформуючої дії рекомбінантного протеїну використовувались клітини лінії 3T3. Клітини висівали у 6-лункові планшети з розрахунку 5×10^5 клітин на лунку у поживному середовищі RPMI-1640, що містило 10 % ФБС. Через 24 год поживне середовище з ФБС замінювали таким, що містило визначені концентрації рекомбінантного HB-EGF. Як позитивний контроль використовували вінкристин у концентрації 10 нг/мл, тоді як негативним контролем слугували інтактні клітини без додавання досліджуваних речовин.

Клітини інкубували у присутності досліджуваних агентів протягом 48 год у умовах 37°C та 5 % CO_2 . Після завершення інкубації культуральне середовище RPMI-1640 видаляли, а клітини тричі промивали свіжим середовищем. Після промивання в кожен лунку додавали по 4 мл поживного середовища RPMI-1640 з 10 % ФБС. Подальше культивування здійснювали у CO_2 -інкубаторі при 37°C із заміною середовища кожні 3 доби до формування щільного клітинного моношару.

2.2.13. Цитоморфологічний аналіз клітин

Цитоморфологічні зміни клітин оцінювали на так само клітинній лінії 3T3. Клітини висівали у стерильних умовах на покривні скельця, розміщені у культуральних планшетах, у кількості 5×10^4 клітин на зразок у середовищі RPMI-1640, доповненому 10 % ФБС. Через 24 год після висіву до клітин додавали рекомбінантний HB-EGF у концентраціях 500 нг/мл та 1000 нг/мл. Як позитивний контроль використовували вінкристин у концентрації 10 нг/мл, тоді як негативним контролем слугували інтактні клітини. Подальшу інкубацію проводили протягом 72 год у CO_2 -інкубаторі при 37°C та 5 % CO_2 у вологій атмосфері.

Після завершення інкубації клітини фіксували сумішшю метанолу та ацетону (1:1) при температурі -20°C протягом 120 хв. Зафіксовані клітини фарбували пропідієм йодидом у концентрації 2 мкг/мл ФБС протягом 5 хв. Після фарбування зразки тричі промивали ФБС для видалення надлишку барвника. Морфологічний аналіз проводили за допомогою флуоресцентного мікроскопа «Axiostar Plus» («Carl Zeiss», Німеччина), оснащеного УФ-джерелом світла та цифровою камерою, при збільшенні $\times 400$ та $\times 1000$.

2.3. Статистичний аналіз отриманих даних

Для обробки отриманих експериментальних даних застосовували загальноприйняті статистичні методи. Нормальність розподілу величин у групах перевіряли за допомогою W-критерію Шапіро-Уїлка. Кількісні показники подано у форматі $M \pm m$, де M – середнє значення, а m – похибка середнього арифметичного.

Статистично значущими вважали відмінності за умови $p < 0,05$. Математичні розрахунки виконано із використанням стандартних програмних пакетів. Для розрахунків і побудови графічних матеріалів використовували «Microsoft Excel 2016».

РОЗДІЛ 3

РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕНЬ ТА ОБГОВОРЕННЯ

3.1. Отримання та очищення рекомбінантного HB-EGF людини

Для отримання функціонально активного рекомбінантного HB-EGF було очищено плазмідну ДНК *pET32a-hb-egf* з клітин *E. coli* DH10B. Клітини *E. coli* BL 21 (DE3) були трансформовані очищеною плазмідною *pET32a-hb-egf*. Клон-продуцент рекомбінантного протеїну (6His-TRX-HB-EGF) експресували у середовищі LB, де відбувалась експресія цільового гена за допомогою ПТТГ, що запускав транскрипцію *lac* оперона. 6His-TRX-HB-EGF був виділений з клітин *E. coli* BL 21 (DE3) та очищений за допомогою метал-афінної хроматографії на Co^{2+} -NTA агарозі.

За попередньо оптимізованим протоколом було виділені різні зразки рекомбінантного HB-EGF, отримані з *E. coli*, трансформованої плазмідними векторами *pET32a-6His-TRX-sHB-EGF* та *pET24b-sHB-EGF-6His*.

Використання метал-афінної хроматографії на Co^{2+} -NTA дало можливість отримати чистий, функціонально-активний протеїн з клонів-продуцентів *pET32a-6His-TRX-sHB-EGF* та *pET24b-sHB-EGF-6His*. Під час елюції було зібрано і проаналізовано фракції по 0,5 мл.

Концентрацію було виміряно за методом Бредфорда у пробах № 2-5 (табл. 3.1), адже за попередніх виділень протеїну саме на цих фракція був показаний найвищий вихід цільового протеїну.

Найвищу концентрацію рекомбінантного протеїну було виявлено у фракціях № 3 для обох експресійних конструкцій – *pET32a-6His-TRX-sHB-EGF* та *pET24b-sHB-EGF-6His*.

Таблиця 3.1

Концентрація рекомбінантного НВ-EGF, отриманого від різних штамів-продуцентів *Escherichia coli*, що містили генетичні конструкції на основі експресійних векторів

($M \pm m$; n = 3)

Номер фракції	Концентрація (мг/мл)	
	Вектор <i>pET32a-6His-TRX-sHB-EGF</i>	Вектор <i>pET24b-sHB-EGF-6His</i>
2	0,02 ± 0,01	0,04 ± 0,01
3	0,16 ± 0,01	0,28 ± 0,02
4	0,11 ± 0,01	0,14 ± 0,01
5	0,03 ± 0,01	0,07 ± 0,01

На наступному етапі дослідження чистоту білків у цих фракціях оцінювали методом 10 % ДСН-ПААГ електрофорезу протеїнів за денатуруючих умов, що також дозволило підтвердити відповідність молекулярної маси виділених протеїнів очікуваним значенням.

Молекулярна маса рекомбінантного протеїну, отриманого за допомогою плазмиди *pET32* складала 28 кДа (рис. 3.1).

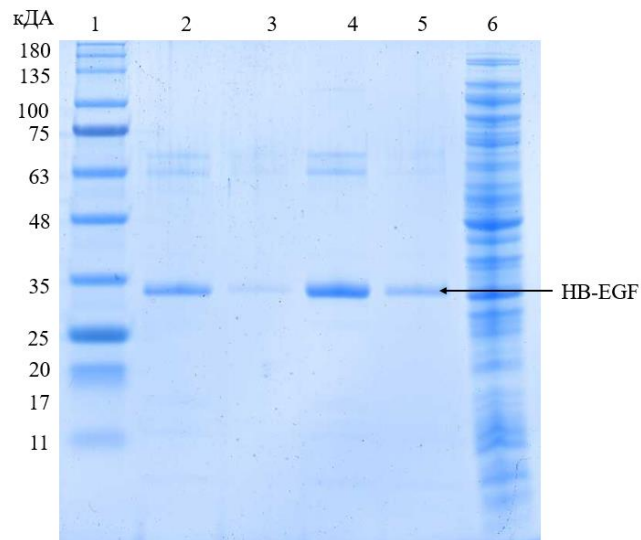


Рис. 3.1. Електрофореграма рекомбінантного HB-EGF, отриманого за допомогою експресійного вектора *pET32a-6His-TRX-sHB-EGF*: 1 – маркер молекулярної маси (кДа); 2-5 – виділені зразки HB-EGF; 6 – бактерійний лізат з HB-EGF до очищення на метал-афінному сорбенті

У свою чергу, маса протеїну, отриманого за допомогою експресійного вектора *pET24b*, становила приблизно 10 кДа (рис. 3.2).

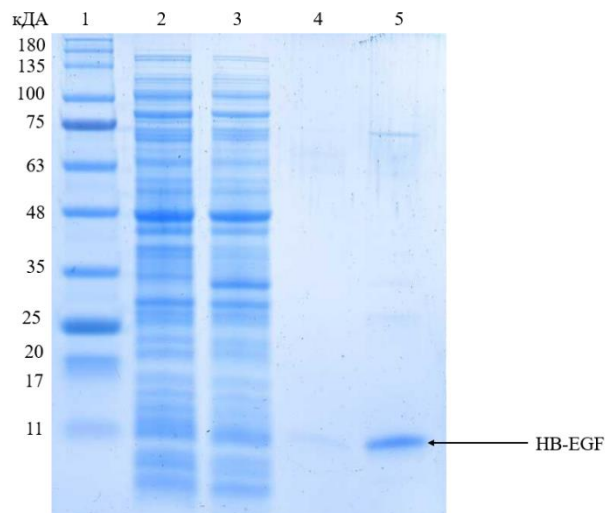


Рис. 3.2. Електрофореграма рекомбінантного HB-EGF, отриманого за допомогою експресійного вектора *pET24b-sHB-EGF-6His*: 1 – маркер молекулярної маси (кДа); 2 – бактерійний лізат з HB-EGF до очищення на метал-афінному сорбенті; 3 – незв'язана фракція HB-EGF, виділена після промивання 15 об'ємами колонки; 4-5 – виділені зразки HB-EGF

3.2. Оцінка трансформуючої активності рекомбінантного HB-EGF людини

Трансформуючу активність отриманого HB-EGF оцінювали шляхом аналізу морфологічних особливостей росту клітин після експозиції з протеїном у концентраціях 500 та 1000 нг/мл. Як позитивний контроль використовували вінкристин у концентрації 10 нг/мл. Оцінку проводили за характером росту клітинного моношару, наявністю або відсутністю ознак втрати контактної гальмування, а також за формуванням багатошарових вогнищ трансформації (рис. 3.3).

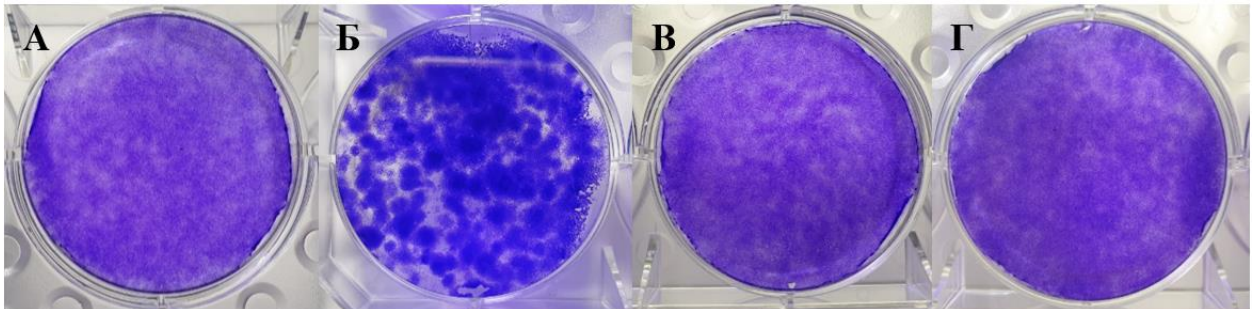


Рис. 3.3. Морфологічна оцінка трансформуючої активності HB-EGF на клітинній лінії 3T3: інтактні клітини (А), клітини, інкубовані вінкристином (Б), клітини, оброблені 500 нг/мл (В) і 1000 нг/мл (Г) (зabarвлення кристалічним фіолетовим)

Додатково було проведено цитоморфологічний аналіз клітин через 72 год після обробки з метою виявлення патологій мітозу (рис. 3.4-3.6). У групі негативного контролю клітини формували типовий однорідний моношар без ознак багатошарового росту. Після інкубації клітин з HB-EGF у концентраціях 500 та 1000 нг/мл також зберігали характерну морфологію та впорядкований ріст, без формування фокусів трансформації. При цьому в дослідних групах спостерігали збільшення кількості клітин порівняно з інтактним контролем, що може свідчити про проліферативний вплив HB-EGF, однак без ознак трансформуючої активності.

Клітини позитивного контролю після дії вінкристину мали виражені зміни морфології клітин і характеру їх росту. Зокрема, спостерігали втрату орієнтованого росту, зниження адгезії до субстрату, порушення контактного гальмування та формування багатошарових колоній морфологічно змінених клітин. Такі зміни свідчили про наявність трансформуючого впливу позитивного контролю на клітини 3T3.

В інтактних клітинах (негативний контроль) під час цитоморфологічного аналізу патологій мітозу не спостерігали. Клітини перебували на різних стадіях мітотичного поділу, зокрема у метафазі, анафазі, телофазі та на стадії цитокінезу, без видимих ознак порушень (рис. 3.4).

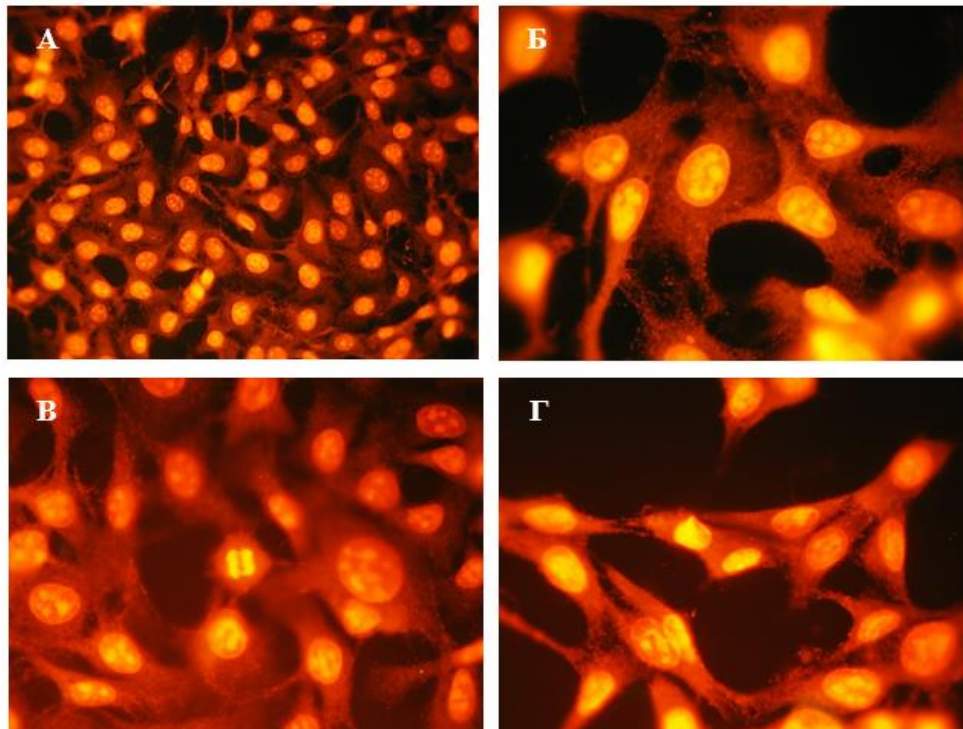


Рис. 3.4. Цитоморфологічна оцінка патологій мітозу у інтактних клітин 3T3. Мікрофотографія загального вигляду клітин (Ок.×10, Об.×40) (А), клітини у телофазі мітозу, цитокінез (Б), клітини у метафазі мітозу (В), клітини у профазі мітозу (Г) (зabarвлення пропідій йодидом; Ок.×10, Об.×100)

У клітинах, оброблених вінкристином (позитивний контроль), виявляли численні патології мітозу, серед яких мікроядра, протрузії ядерної мембрани,

а також двоядерні та багатоядерні клітини, що свідчить про порушення нормального перебігу мітотичного поділу та цитокінезу (рис. 3.5).

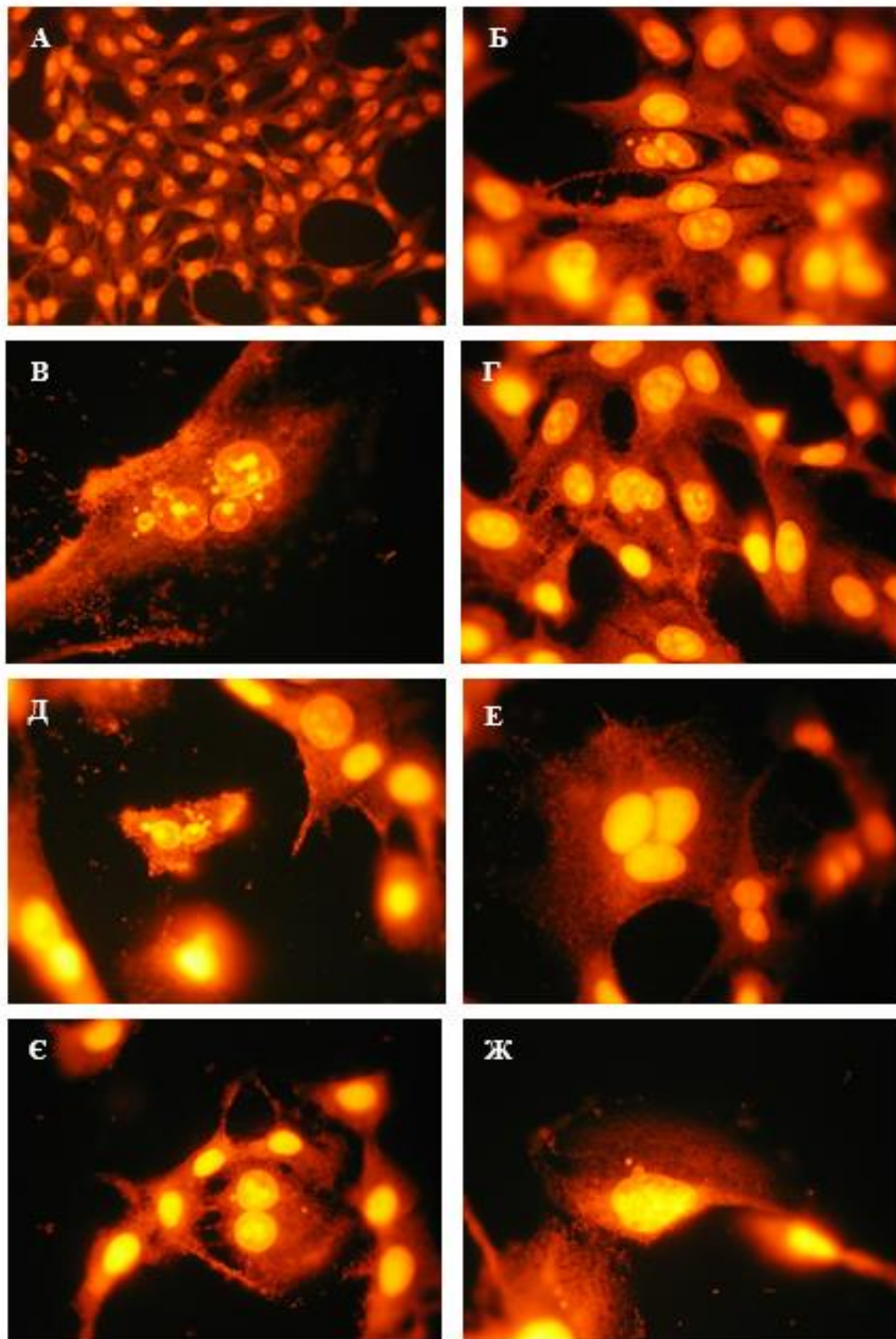


Рис. 3.5. Цитоморфологічні ознаки порушень мітозу клітинної лінії 3Т3 після експозиції з вінкристином. Мікрофотографія загального вигляду клітин (Ок.×10, Об.×40) (А), мікроядра в бінклеарній клітині (Б), багатоядерні

клітини з мікроядрами та протрузіями ядра (В-Г), мікроядра і протрузії ядра (Д, Ж), багатоядерну клітину (Е), клітину з мікроядрами (Є) (зabarвлення пропідій йодидом; Ок.×10, Об.×100)

У клітинах, оброблених рекомбінантним НВ-EGF, подібних патологічних змін не виявляли. У цих групах, як і в негативному контролі, спостерігали клітини на різних стадіях мітозу без ознак порушення (рис. 3.6).

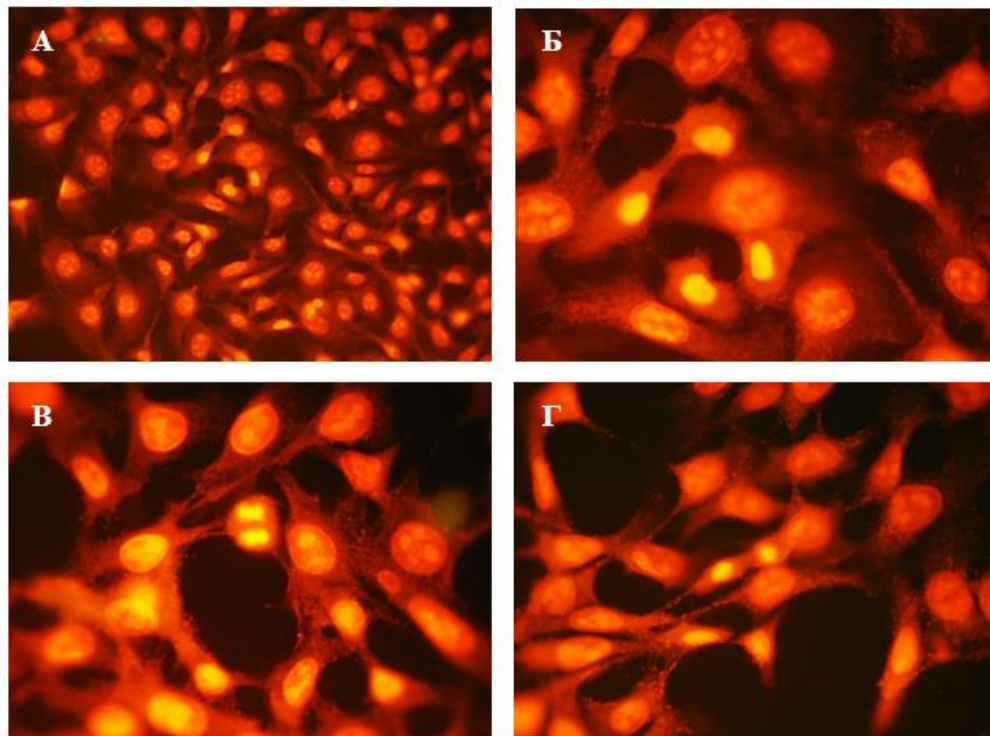


Рис. 3.6. Цитоморфологічна оцінка фібробластів клітинної лінії 3T3 після інкубації з НВ-EGF. Мікрофотографія клітини після внесення НВ-EGF у концентрації 1000 нг/мл: загальний вигляд клітин (Ок.×10, Об.×40), (А) клітини у телофазі мітозу та цитокінезі (Б); 500 нг/мл: клітини в анафазі мітозу (В) і клітини у телофазі мітозу та цитокінезі (Г) (зabarвлення пропідій йодидом; Ок.×10, Об.×100)

Отримані результати свідчать про те, що НВ-EGF у концентраціях 500 та 1000 нг/мл не індукує морфологічних і цитоморфологічних змін, характерних

для клітинної трансформації клітинної лінії 3T3, а отже, не виявляє трансформуючої активності *in vitro*.

3.3. Зв'язування рекомбінантного НВ-EGF людини з поверхневими рецепторами

Здатність флюоресцентно міченого НВ-EGF взаємодіяти з рецепторами клітинної лінії A431 оцінювали методом протокової цитофлуориметрії. Аналіз зв'язування mCherry-НВ-EGF із клітинами проводили за каналом EDC-A на протоковому цитометрі DxFLEX (рис. 3.7).

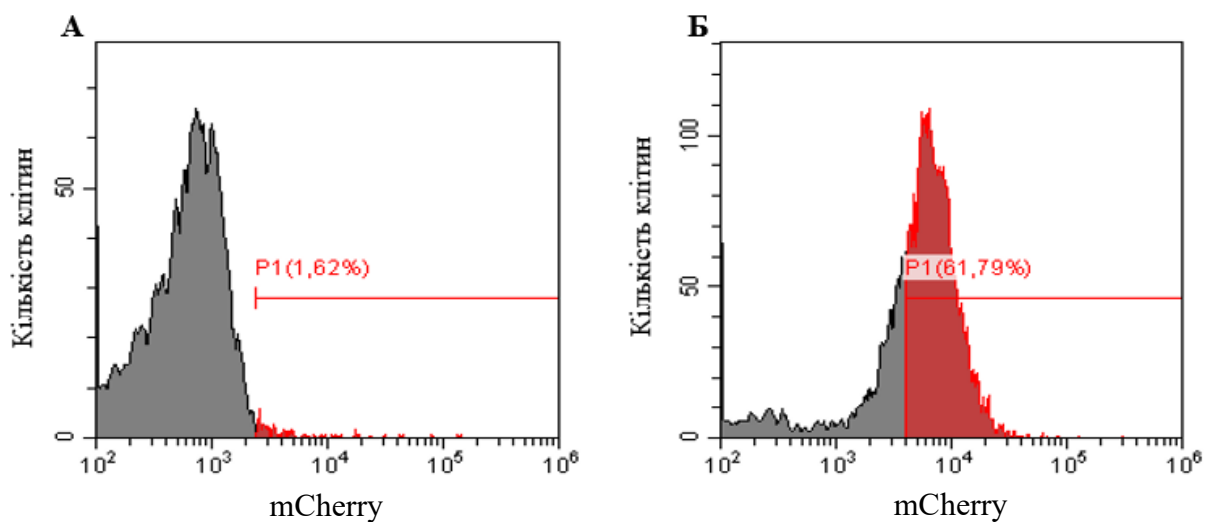


Рис. 3.7. Гістограми розподілу клітинної популяції A431 за інтенсивністю флуоресценції. Клітини після інкубації з mCherry (А), клітини після інкубації з рекомбінантним mCherry-НВ-EGF (Б)

Показано, що після інкубації клітинної лінії A431 з mCherry-НВ-EGF частка зв'язаних клітин становила близько 61,79 %. Це свідчить про збереження функціональної активності ростового фактора, оскільки його флюоресцентне похідне здатне специфічно взаємодіяти з клітинною поверхнею. Водночас при інкубації клітин A431 з mCherry зв'язування з рецепторами не спостерігали.

Отримані результати вказують на те, що одержаний mCherry-НВ-EGF зберігає здатність до взаємодії з рецепторами клітинної лінії *A431*, зокрема EGFR та ErbB4.

3.4. Вплив рекомбінантного НВ-EGF людини на проліферативну активність клітин

Була проведена оцінка проліферативного впливу рекомбінантного НВ-EGF на клітинні лінії *Vero*, *3T3*, *HEK293*, *L929* та *A431*. Отримані значення оптичного поглинання, визначені за допомогою МТТ-тесту (рис. 3.8), свідчать про зміну метаболічної активності клітин у відповідь на вплив досліджуваного протеїну.

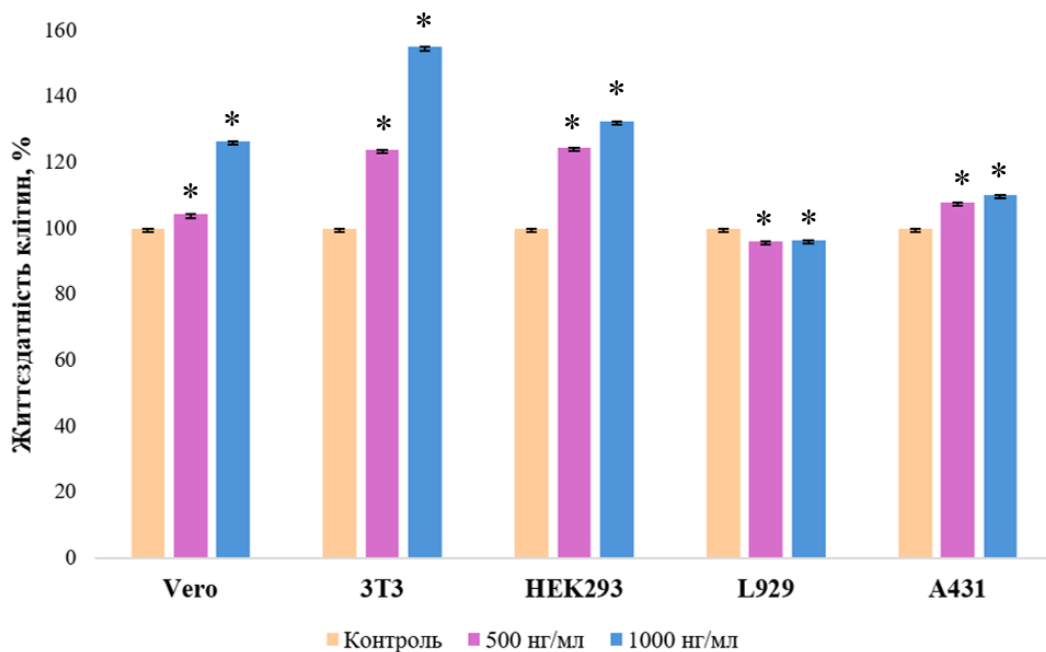


Рис. 3.8. Проліферативна активність клітинних ліній *Vero*, *3T3*, *HEK293*, *L929* та *A431* під впливом різних концентрацій рекомбінантного НВ-EGF, виміряна за допомогою МТТ-тесту

* – $p < 0,05$ порівняно з контролем

Встановлено, що HB-EGF чинить стимулюючий вплив на проліферативну активність клітин *Vero*, *3T3*, *HEK293* та *A431* що проявляється у підвищенні показників оптичного поглинання розчинених гранул формагану порівняно з контролем. Водночас для клітинної лінії *L929* суттєвих змін проліферативної активності не виявлено, що може свідчити про клітинно-специфічний характер дії HB-EGF.

Найбільш виражений мітогенний ефект спостерігався для клітинних ліній *Vero*, *3T3* та *HEK293*. Зокрема, для клітинної лінії *Vero* обробці 500 нг/мл рекомбінантного HB-EGF показник збільшився на 4,3 %, а при 1000 нг/мл – до 0,496 (+ 26,5 %). Для клітинної лінії *3T3* відповідні значення зросли з 0,083 до 0,103 (+ 24 %) та до 0,129 (+ 55 %), що свідчить про найбільш виражену проліферативну відповідь. Аналогічна тенденція спостерігається для клітинної лінії *HEK293*, де показник підвищувався з 0,110 до 0,137 (+ 24,6 %) при 500 нг/мл та до 0,146 (+ 32,5 %) при інкубації з 1000 нг/мл HB-EGF.

Для клітинної лінії *A431* також спостерігалось підвищення метаболічної активності, однак менш виражене: з 0,943 до 1,017 (+ 7,8 %) при 500 нг/мл та до 1,040 (+ 10,2 %) при 1000 нг/мл, що вказує на помірний мітогенний ефект.

Водночас для клітинної лінії *L929* стимулюючого впливу HB-EGF не виявлено: при концентрації 500 нг/мл показник незначно зменшився з 0,0286 до 0,0275 (- 3,8 %), а при 1000 нг/мл практично не змінився – 0,0276 (- 3,5 %).

3.5. Оцінка цитопротекторних властивостей рекомбінантного HB-EGF людини

Цитопротекторні властивості були виміряні за допомогою оцінки виживаності клітин при дії УФ променів з довжиною хвилі 365 нм (інтенсивність опромінення 4,4 мВ/см², сумарна доза 132 мДж/см²) та інкубації в різній концентрації HB-EGF експресійних конструкцій – *pET24b-sHB-EGF-6His* (рис. 3.9) та *pET32a-6His-TRX-sHB-EGF* (рис. 3.10) та у концентраціях

500, 1000 та 1500 нг/мл протягом 24 год. Для вимірювання ступеню виживаності використали МТТ-тест, де значення оптичного поглинання були представлені у відсотках відносно контролю, який приймали за 100 %.

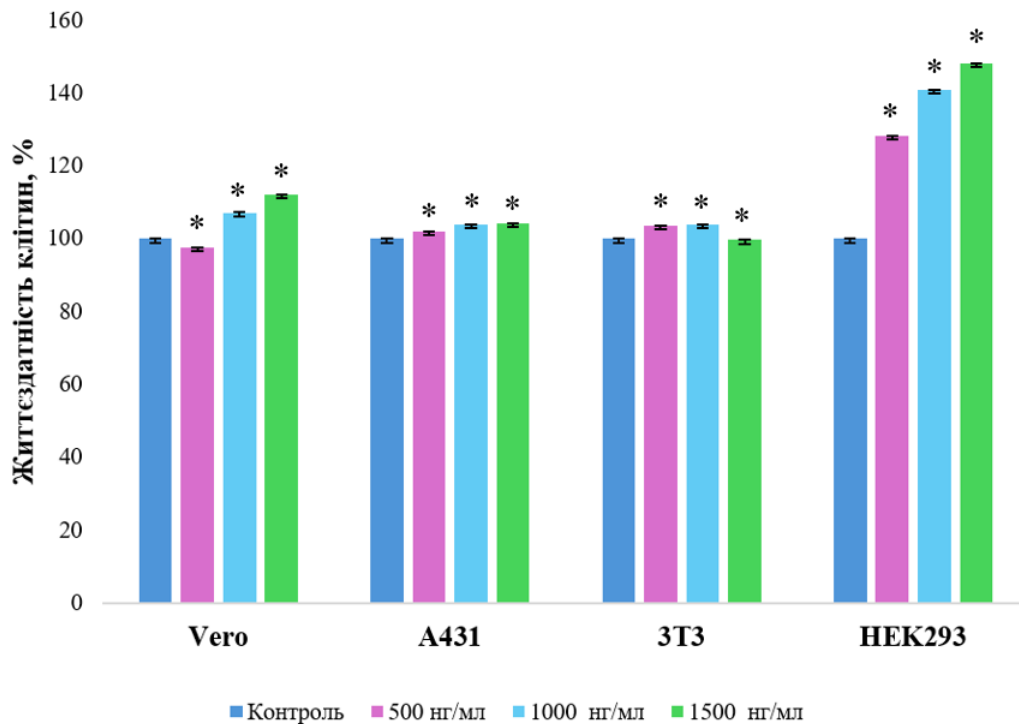


Рис. 3.9. Життєздатність клітинних ліній *A431*, *L929*, *Vero* та *HEK293* під впливом різних концентрацій рекомбінантного HB-EGF, отриманого на основі експресійного вектора *pET32a-6His-TRX-sHB-EGF*, виміряна за допомогою МТТ-тесту

* – $p < 0,05$ порівняно з контролем

У клітинах *Vero* вплив HB-EGF на основі експресійної плазмиди *pET24b-sHB-EGF-6His* мав помірний дозозалежний характер. Так, при концентрації 500 нг/мл життєздатність клітин знижувалася на 2,5 % порівняно з контролем. Водночас при збільшенні концентрації до 1000 нг/мл спостерігалось підвищення життєздатності на 7,2 %, а при 1500 нг/мл – на 12,2 %.

На клітинній лінії *A431* дія даного HB-EGF була слабо виражена. При 500 нг/мл життєздатність клітин зростала на 1,9 %, а при 1000 нг/мл

підвищення становило 4,0 %. Однак при концентрації 1500 нг/мл показник життєздатності клітин, дещо знижувався на 0,7 %.

У клітинній лінії *3T3* також виявлено слабкий захисний ефект. При концентраціях 500 та 1000 нг/мл життєздатність підвищувалася на 3,5 % та 4,0 % відповідно, тоді як при 1500 нг/мл показник практично повертався до контрольного рівня.

Найбільш виражений вплив рекомбінантного HB-EGF спостерігався у клітинах *HEK293*. При обробці протеїном у концентрації 500 нг/мл життєздатність підвищувалася на 28,2 % порівняно з контролем. При інкубації з 1000 нг/мл це підвищення становило 41,0 %, а при 1500 нг/мл – 48,1 %. Отримані дані свідчать про чітко виражений цитопротекторний ефект у клітинній лінії *HEK293*.

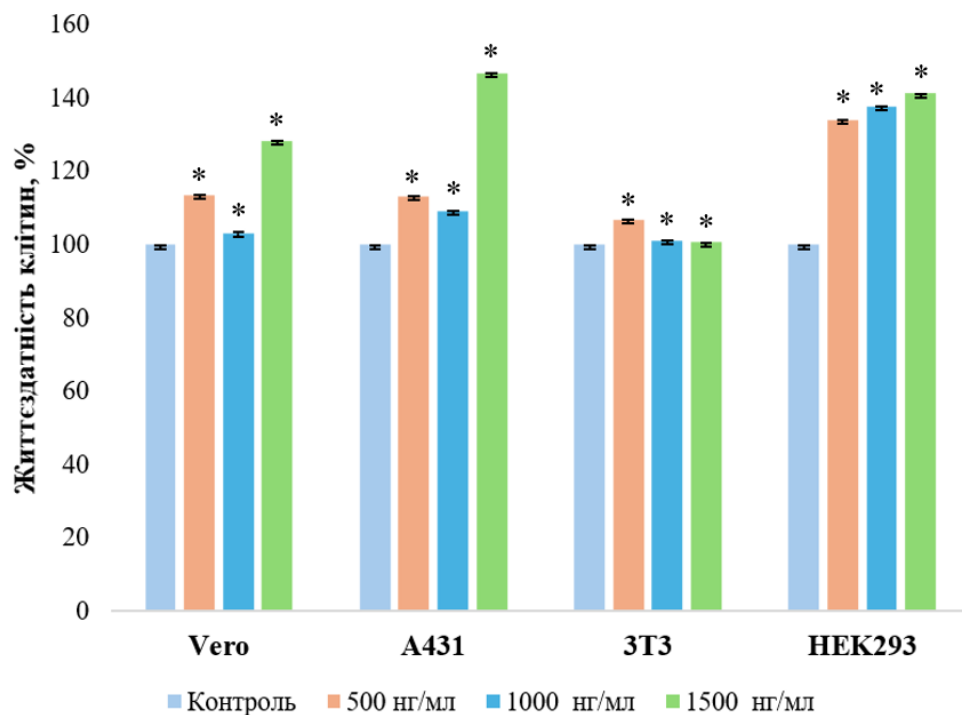


Рис. 3.10. Життєздатність клітинних ліній *A431*, *L929*, *Vero* та *HEK293* під впливом різних концентрацій рекомбінантного HB-EGF, отриманого на основі експресійного вектора *pET24b-sHB-EGF-6His*, виміряна за допомогою МТТ-тесту

* – $p < 0,05$ порівняно з контролем

НВ-EGF плазмиди *pET32* виявляв позитивний вплив на життєздатність клітинної лінії *Vero*, хоча ефект не був повністю лінійним. Так, при концентрації 500 нг/мл життєздатність підвищувалася на 13,5 % порівняно з контролем. При обробці 1000 нг/мл цей ефект був менш вираженим і становив 3,3 %. Водночас при дії 1500 нг/мл спостерігалось найбільше підвищення життєздатності – на 28,4 %, що свідчило про виражений позитивний вплив білка за найвищої дослідженої концентрації.

На клітинній лінії *A431* також відзначався стимулювальний ефект рекомбінантного НВ-EGF. При 500 нг/мл життєздатність клітин зростала на 13,3 %, а при 1000 нг/мл – на 9,2 % відносно контролю. Найбільш виражений ефект спостерігався при концентрації 1500 нг/мл, за якої життєздатність підвищувалася на 46,7 %.

Вплив рекомбінантного НВ-EGF на клітинній лінії *3T3* був незначним. При концентрації 500 нг/мл життєздатність підвищувалася на 6,9 %, тоді як при 1000 нг/мл – лише на 1,2 %. При 1500 нг/мл показник перевищував контрольний рівень лише на 0,7 %.

Найбільший цитопротекторний вплив забезпечив рекомбінантний НВ-EGF для клітинної лінії *HEK293*. При 500 нг/мл життєздатність підвищувалася на 34,1 % відносно контролю, при 1000 нг/мл – на 37,8 %, а при 1500 нг/мл – на 41,3 %.

Отримані результати свідчать про цитопротекторний вплив рекомбінантних форм НВ-EGF на клітинні лінії *L929*, *Vero*, *A431* та *HEK293* після попереднього їх опромінення ультрафіолетовим світлом на довжині хвилі 365 нм. Підвищення життєздатності клітин за даних умов вказує на здатність НВ-EGF стимулювати відновні процеси й активацію механізмів клітинного захисту. НВ-EGF, отриманий з генетичного конструкту *pET24b-sHB-EGF-6His* мав більш виражений цитопротекторний вплив, ніж отриманий з конструкту *pET32a-6His-TRX-sHB-EGF*, що може бути пов'язано з наявністю фрагменту TRX в останнього. Даний домен може впливати на просторову конфігурацію або доступність функціональних ділянок молекули.

Найбільш виражений захисний ефект спостерігався у клітинних лініях *Vero* та *HEK293*, що підтверджує взаємодію білка HB-EGF з рецепторами родини ErbB (EGFR, ErbB4), залученими до активації сигнальних каскадів, відповідальних за виживання та регенерацію клітин після УФ-індукованого стресу. Водночас різний ступінь реакції клітинних ліній на додавання HB-EGF може бути зумовлений варіативністю експресії відповідних рецепторів, що підкреслює специфічність дії досліджуваних рекомбінантних протеїнів.

3.6. Оцінка адаптогенної дії рекомбінантного HB-EGF людини

Адаптогенний вплив рекомбінантного HB-EGF на клітини ліній *3T3* та *A431* оцінювали методом протокової цитофлуориметрії з використанням подвійного фарбування Annexin V-EGFP/PI. У межах дослідження аналізували необроблені та клітини після інкубації з HB-EGF у концентраціях 500, за відсутності УФ-опромінення та за умов попереднього впливу УФ-опромінення, яке використовували для моделювання стресового впливу на клітину. За результатами аналізу визначали частку життєздатних клітин, клітин у ранньому та пізньому апоптозі, а також клітин, що перейшли у некроз.

У першу чергу аналізували вплив рекомбінантного HB-EGF на шляхи загибелі клітинних ліній *3T3* (рис. 3.11) та *A431* (рис. 3.12) за нормальних умов.

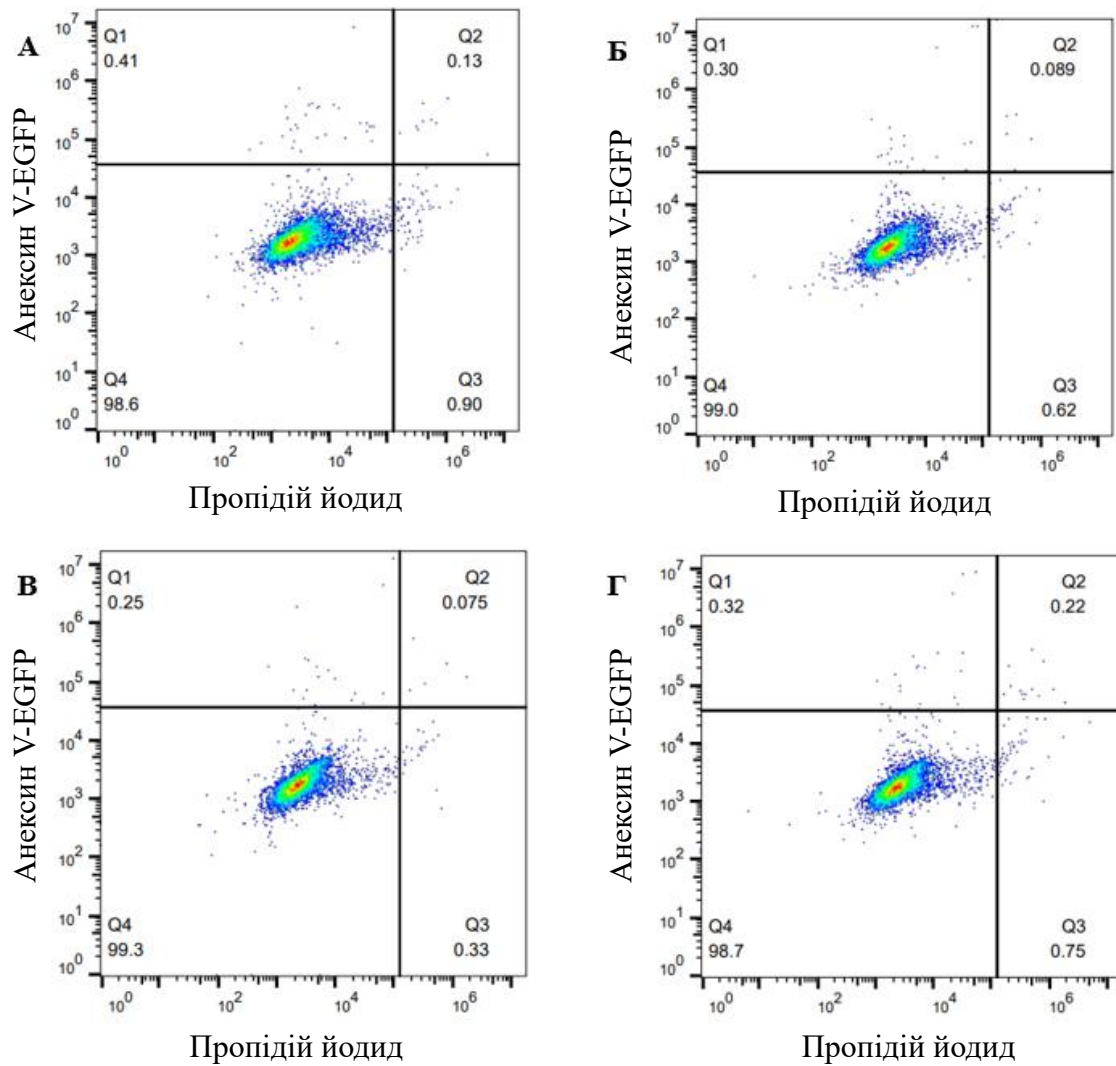


Рис. 3.11. Розподіл клітинної популяції 3T3 за даними протокової цитофлуориметрії: інтактні клітини (А), клітини після інкубації з HB-EGF у концентрації 500 нг/мл (Б), 1000 нг/мл (В), 1500 нг/мл (Г)

У групах без УФ-опромінення дія рекомбінантного HB-EGF супроводжувалася збереженням високої частки життєздатних клітин в обох клітинних лініях. Для клітин 3T3 у контрольній групі частка життєздатних клітин становила 98,6 %, тоді як після інкубації з HB-EGF у концентраціях 500, 1000 та 1500 нг/мл цей показник складав 99,0 %, 99,3 % і 98,7 % відповідно. Одночасно при 500 і 1000 нг/мл спостерігалось зменшення частки клітин у ранньому апоптозі з 0,90 % у контролі до 0,62 % і 0,33 %, а в пізньому апоптозі – з 0,13 % до 0,089 % і 0,075 % відповідно. Також у цих групах відзначали

незначне зменшення частки некротичних клітин: з 0,41 % у контролі до 0,30 % при 500 нг/мл і 0,25 % при 1000 нг/мл. Це свідчить про позитивний вплив HB-EGF на підтримання стабільного стану клітинної популяції 3T3.

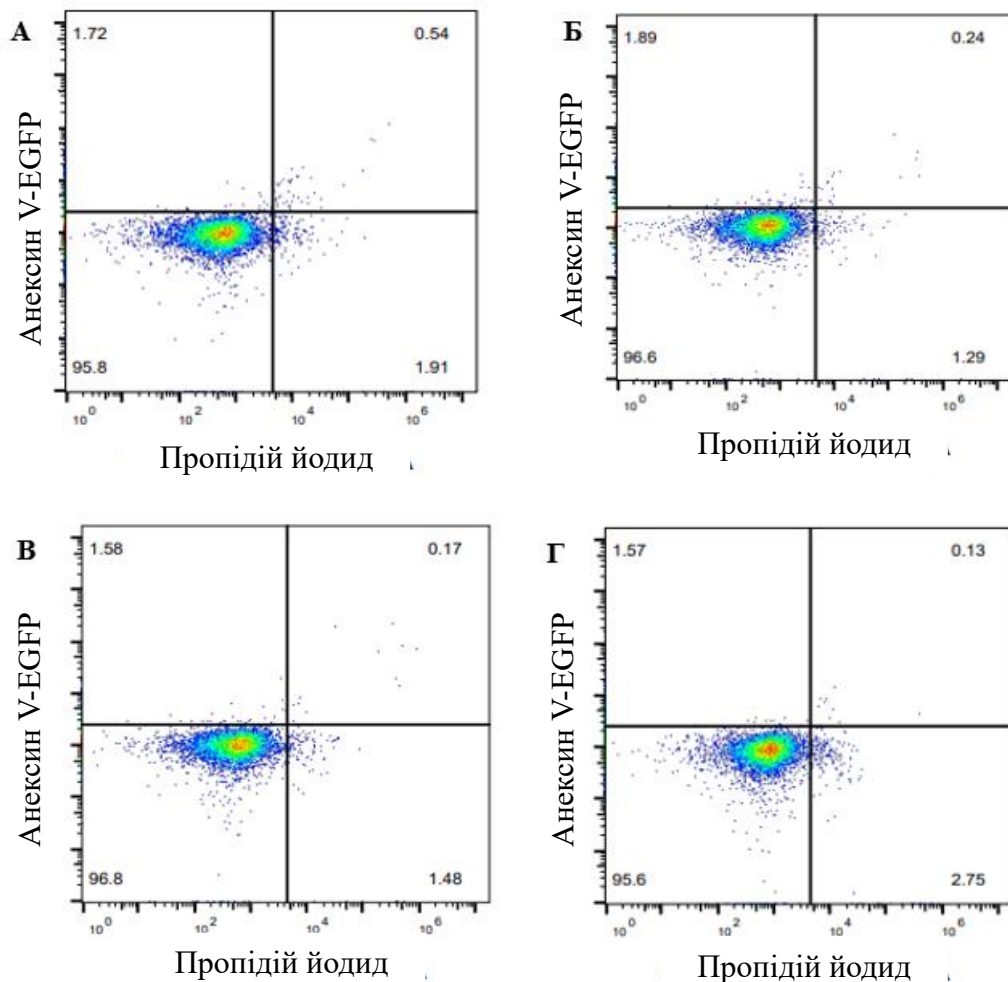


Рис. 3.12. Розподіл клітинної популяції *A431* за даними протокової цитофлуориметрії: інтактні клітини (А), клітини після інкубації з HB-EGF у концентрації 500 нг/мл (Б), 1000 нг/мл (В), 1500 нг/мл (Г)

Для клітинної лінії *A431* спостерігалася подібна тенденція. Частка життєздатних клітин зростала з 95,8 % у контролі до 96,6 % при 500 нг/мл і до 96,8 % при 1000 нг/мл. При цьому частка клітин у пізньому апоптозі знижувалася з 0,54 % у контролі до 0,24 % і 0,17 % відповідно, а частка клітин у некрозі становила 1,89 % при 500 нг/мл і 1,58 % при 1000 нг/мл при контрольному значенні 1,72 %. Для *A431* найбільш сприятливий ефект HB-

EGF у неопромінених клітинах також спостерігали при концентрації 1000 нг/мл, де поряд зі зменшенням апоптотичної популяції відзначалося і незначне зниження частки некротичних клітин.

Для оцінки адаптогенних властивостей рекомбінантного НВ-EGF, зокрема його здатності модулювати стрес-індуковані зміни клітин, подальші дослідження проводили за умов УФ-опромінення таких клітинних ліній: *3T3* (рис. 3.13) та *A431* (рис. 3.14).

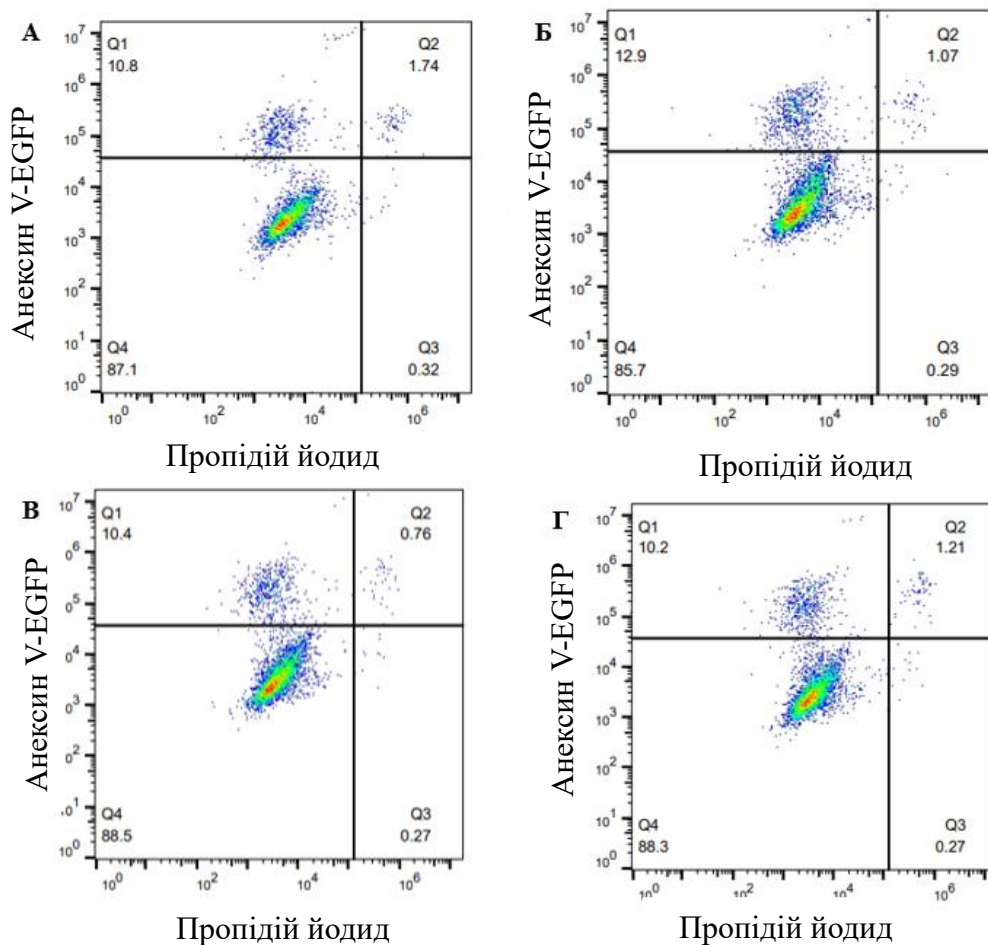


Рис. 3.13. Розподіл клітинної популяції *3T3* за даними протокової цитофлуориметрії за умов УФ-індукованого: опромінені інтактні клітини (А), опромінені клітини після інкубації з НВ-EGF у концентрації 500 нг/мл (Б), 1000 нг/мл (В), 1500 нг/мл (Г)

Після дії УФ-випромінювання в обох клітинних лініях формувалися стрес-індуковані зміни клітинної популяції, однак характер цих змін був

різним. Для клітинної лінії *3T3* основною ознакою УФ-стресу було зростання некротичної популяції: у групі УФ-контролю частка некротичних клітин досягала 10,0 %, тоді як частка клітин у ранньому та пізньому апоптозі становила 0,38 % і 1,12 % відповідно. При додаванні НВ-EGF у концентрації 500 нг/мл позитивної тенденції не виявляли, оскільки частка життєздатних клітин знижувалася до 85,7 %, частка некротичних клітин зростала до 12,9 %. Натомість при концентрації 1000 нг/мл спостерігався найбільш сприятливий ефект: частка життєздатних клітин зберігалася на рівні УФ-контролю – 88,5 %, тоді як частка клітин у ранньому апоптозі знижувалася до 0,27 %, а в пізньому апоптозі – до 0,76 %. Подібна, хоча й менш виражена, тенденція зберігалася і при 1500 нг/мл, де частка раннього апоптозу також становила 0,27 %. У клітинній лінії *3T3* найбільш помітний цитопротекторний вплив НВ-EGF проявлявся не стільки у зменшенні некрозу, скільки у послабленні апоптотичних змін, особливо при концентрації 1000 нг/мл.

У клітинах *A431* відповідь на УФ-опромінення характеризувалася насамперед збільшенням частки клітин у ранньому апоптозі (рис. 3.14). У групі УФ-контролю частка клітин у некрозі становила 1,50 %, у ранньому апоптозі – 2,10 %, а в пізньому апоптозі – 0,17 %. При додаванні НВ-EGF у концентрації 500 нг/мл частка некротичних клітин зростала до 1,87 %, а частка клітин у ранньому апоптозі – до 2,23 %, що не свідчило про адаптогенний ефект. Натомість при 1000 нг/мл спостерігалася найбільш сприятлива тенденція: частка клітин у ранньому апоптозі знижувалася до 1,87 %, а рівень некрозу становив 1,95 %.

Хоча некротична популяція не зменшувалася порівняно з УФ-контролем, саме при цій концентрації спостерігалася найбільш помітне послаблення апоптотичних змін. При 1500 нг/мл частка некротичних клітин зростала до 2,22 %, а ранній апоптоз – до 2,58 %, що вказувало на послаблення адаптогенного ефекту у цій групі. Для клітин *A431* позитивний вплив НВ-EGF за умов УФ-стресу був пов'язаний передусім зі зменшенням апоптотичної популяції, тоді як некроз залишався менш чутливим до дії протеїну.

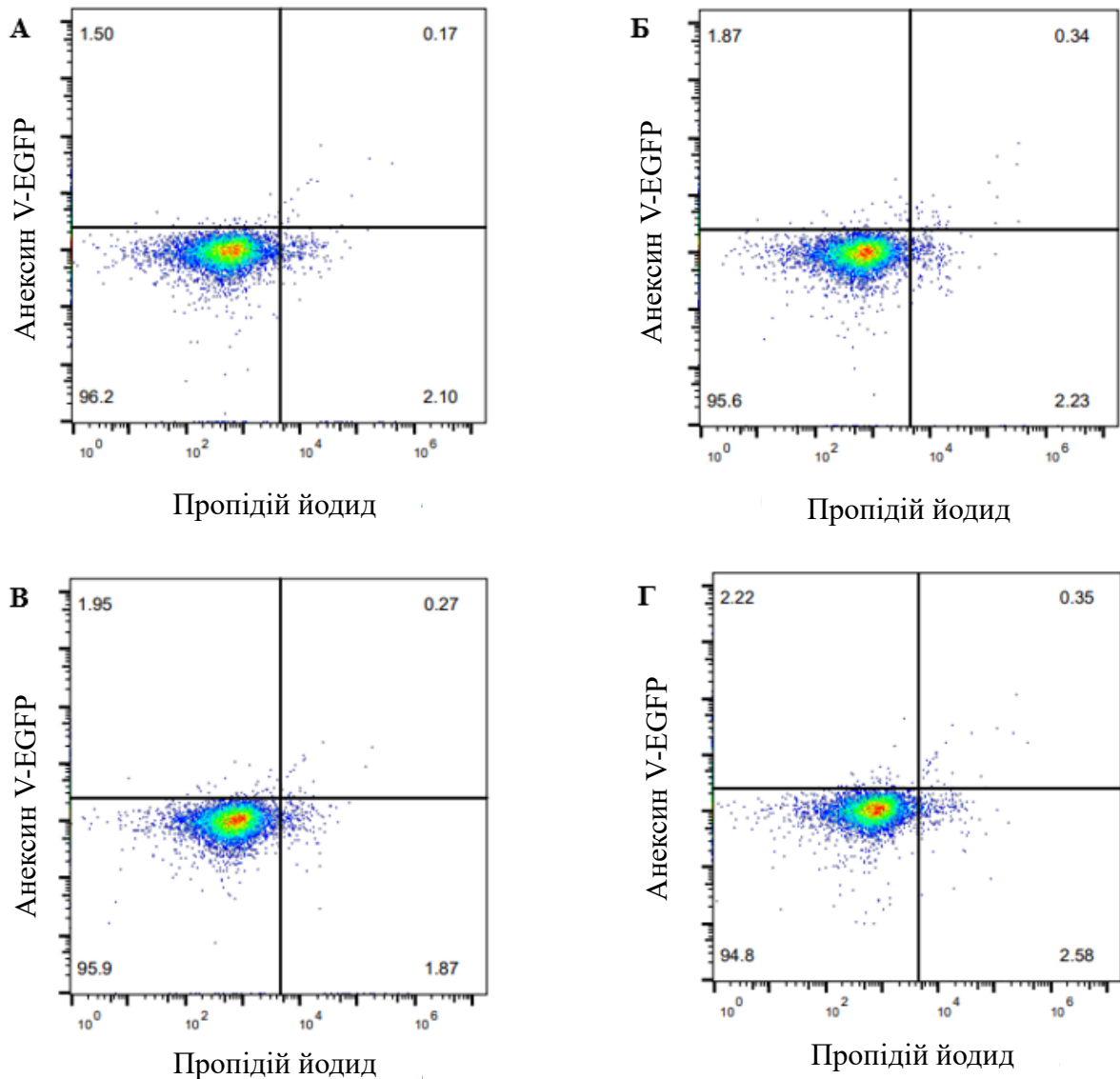


Рис. 3.14. Розподіл клітинної популяції *A431* за даними протокової цитофлуориметрії за умов УФ-індукованого: опромінені інтактні клітини (А), опромінені клітини після інкубації з HB-EGF у концентрації 500 нг/мл (Б), 1000 нг/мл (В), 1500 нг/мл (Г)

Таким чином, рекомбінантний HB-EGF проявляє помірний адаптогенний вплив на клітини *3T3* та *A431*, зменшуючи частку апоптотично змінених клітин та частково стабілізуючи некротичну популяцію, при цьому найбільш виражений ефект спостерігається при концентрації 1000 нг/мл. Отже, рекомбінантний HB-EGF є функціонально активним протеїном, який проявляє мітогенну та цитопротекторну дію, не виявляє трансформуючої активності у

відповідних умовах та чинить помірний адаптогенний вплив за умов УФ-індукованого стресу.

ВИСНОВКИ

Таким чином, у роботі охарактеризовано адаптогенні властивості рекомбінантного HB-EGF у регуляції стрес-індукованих змін у клітині. Показано, що рекомбінантний HB-EGF є функціонально активним протеїном, проявляє мітогенну та цитопротекторну дію, не виявляє трансформуючої активності у досліджених умовах та чинить помірний адаптогенний вплив за умов УФ-індукованого стресу.

1. Одержано та очищено рекомбінантні форми HB-EGF людини на основі експресійних конструкцій *pET32a-6His-TRX-sHB-EGF* та *pET24b-sHB-EGF-6His*.

2. Встановлено, що рекомбінантний HB-EGF людини проявляє мітогенну та цитопротекторну дію на клітинних лініях *A431*, *Vero*, *3T3*, *HEK293*.

3. Показано, що рекомбінантний HB-EGF людини у концентраціях 500 та 1000 нг/мл не виявляє трансформуючої активності щодо клітинної лінії *3T3*.

4. Виявлено, що рекомбінантний HB-EGF людини за умов УФ-індукованого стресу дозозалежно сприяв зменшенню частки апоптотично змінених клітин та підтриманню життєздатної клітинної популяції.

СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ

1. Adam, R. (2009). Role of HB-EGF in cancer. *Atlas Genet Cytogenet Oncol Haematol*, 15(7), pp. 610–619.
2. Allahverdian, S., Harada, N., Singhera, G., Knight, D. and Dorscheid, D. (2008). Secretion of IL-13 by airway epithelial cells enhances epithelial repair via HB-EGF. *American journal of respiratory cell and molecular biology*, 38(2), pp. 153–160.
3. Besner, G. (1998). Structure and function of heparin-binding EGF-like growth factor HB-EGF. *Frontiers in Bioscience*, 3(4), pp. 288–299.
4. Boonstra, J., Rijken, P., Humbel, B., Cremers, F., Verkleij, A. and van Bergen en Henegouwen, P. (1995). The epidermal growth factor. *Cell Biology International*, 19(5), pp. 413–430.
5. Caplan, M. and Jilling, T. (2001). New concepts in necrotizing enterocolitis. *Current Opinion in Pediatrics*, 13(2), pp. 111–114.
6. Chen, C., Yu, X., James, I., Zhang, H., Yang, J., Radulescu, A., Zhou, Y. and Besner, G. (2012). Heparin-binding EGF-like growth factor protects intestinal stem cells from injury in a rat model of necrotizing enterocolitis. *Laboratory Investigation*, 92(3), pp. 331–344.
7. Choe, S., Bennett, M., Fujii, G., Curmi, P., Kantardjieff, K., Collier, R. and Eisenberg, D. (1992). The crystal structure of diphtheria toxin. *Nature*, 357(6375), pp. 216–222.
8. Dao, D., Anez-Bustillos, L., Adam, R., Puder, M. and Bielenberg, D. (2018). Heparin-binding epidermal growth factor-like growth factor as a critical mediator of tissue repair and regeneration. *The American Journal of Pathology*, 188(11), pp. 2446–2456.
9. Das, S., Wang, X., Paria, B., Damm, D., Abraham, J., Klagsbrun, M., Andrews, G. and Dey, S. (1994). Heparin-binding EGF-like growth factor gene is induced in the mouse uterus temporally by the blastocyst solely at the site of its

- apposition: a possible ligand for interaction with blastocyst EGF-receptor in implantation. *Development*, 120(5), pp. 1071–1083.
10. Didan, A. (2024). Heparin-binding egf-like growth factor as a prospective mediator of tissue repair and regeneration. *Biotechnologia Acta*, 17(2), pp. 33–36.
 11. Ding, B., Nolan, Daniel J., Guo, P., Babazadeh, Alexander O., Cao, Z., Rosenwaks, Z., Crystal, Ronald G., Simons, M., Sato, Thomas N., Worgall, S., Shido, K., Rabbany, Sina Y. and Rafii, S. (2011). Endothelial-derived angiocrine signals induce and sustain regenerative lung alveolarization. *Cell*, 147(3), pp. 539–553.
 12. Dronko, L., Lutsenko, T., Korotkevych, N., Vovk, I., Zhukova, D., Romaniuk, I., Siromolot, A., Labyntsev, J. and Kolybo, D. (2024). Heparin-binding EGF-like growth factor: mechanisms of biological activity and potential therapeutic applications. *The Ukrainian Biochemical Journal*, 96(5), pp. 5–20.
 13. Elenius, K., Corfas, G., Paul, S., Choi, C., Rio, C., Plowman, G. and Klagsbrun, M. (1997). A novel juxtamembrane domain isoform of HER4/ErbB4. *Journal of Biological Chemistry*, 272(42), pp. 26761–26768.
 14. Fang, L. (2001). p53 induction of heparin-binding EGF-like growth factor counteracts p53 growth suppression through activation of MAPK and PI3K/Akt signaling cascades. *The EMBO Journal*, 20(8), pp. 1931–1939.
 15. Feng, J., El-Assal, O. and Besner, G. (2005). Heparin-binding EGF-like growth factor (HB-EGF) and necrotizing enterocolitis. *Seminars in Pediatric Surgery*, 14(3), pp. 167–174.
 16. Ferreira, A., Lopacinski, A., Batista, M., Hiraiwa, P., Guimarães, B. and Zanchin, N. (2022). A toolkit for recombinant production of seven human EGF family growth factors in active conformation. *Scientific Reports*, 12(8), pp. 134–142.
 17. Fridman, J., Caulder, E., Hansbury, M., Liu, X., Yang, G., Wang, Q., Lo, Y., Zhou, B., Pan, M., Thomas, S., Grandis, J., Zhuo, J., Yao, W., Newton, R., Friedman, S., Scherle, P. and Vaddi, K. (2007). Selective inhibition of ADAM

- metalloproteases as a novel approach for modulating erbb pathways in cancer. *Clinical cancer research*, 13(6), pp. 1892–1902.
18. Harding, P., Brigstock, D., Shen, L., Crissman-Combs, M. and Besner, G. (1996). Characterization of the gene encoding murine heparin-binding epidermal growth factor-like growth factor. *Gene*, 169(2), pp. 291–292.
 19. Hashimoto, K., Higashiyama, S., Hashimura, A., E, Kobayashi, T., Sudo, K., Nakagawa, T., Damm, D., Yoshikawa, K. and Taniguchi, N. (1994). Heparin-binding epidermal growth factor-like growth factor is an autocrine growth factor for human keratinocytes. *Journal of Biological Chemistry*, 269(31), pp. 20060–20066.
 20. Ito, J., Harada, N., Nagashima, O., Makino, F., Usui, Y., Yagita, H., Okumura, K., Dorscheid, D., Atsuta, R., Akiba, H. and Takahashi, K. (2011). Wound-induced TGF- β 1 and TGF- β 2 enhance airway epithelial repair via HB-EGF and TGF- α . *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 412(1), pp. 109–114.
 21. Johnson, N. and Wang, Y. (2015). Coacervate delivery of HB-EGF accelerates healing of type 2 diabetic wounds. *Wound Repair and Regeneration*, 23(4), pp. 591–600.
 22. Kageyama, T., Miyamoto, S., Mizushima, H., Iwamoto, R. and Mekada, E. (2007). Diphtheria Toxin Mutant CRM197 Possesses weak EF2-ADP-ribosyl activity that potentiates its anti-tumorigenic activity. *Journal of Biochemistry*, 142(1), pp. 95–104.
 23. Kim, S., Subramanian, V., Abdel-Latif, A. and Lee, S. (2020). Role of heparin-binding epidermal growth factor-like growth factor in oxidative stress-associated metabolic diseases. *Metabolic Syndrome and Related Disorders*, 7(989), pp. 37–43.
 24. Kiso, S., Kawata, S., Tamura, S., Yoshiaki, I., Yoshida, Y., Sawai, Y., Umeki, S., Ito, N., Yamada, A., Miyagawa, J., Higashiyama, S., Iwawaki, T., Saito, M., Taniguchi, N., Matsuzawa, Y. and Kohno, K. (2003). Liver regeneration in

- heparin-binding EGF-like growth factor transgenic mice after partial hepatectomy. *Gastroenterology*, 124(3), pp. 701–707.
25. Komisarenko, S., Kolybo, D., Krynina, O. and Siromolot, A. (2020). Antiproliferative and apoptotic effects of anti-human HB-EGF neutralizing polyclonal antibodies in vitro. *Experimental Oncology*, 42(1) pp. 25–30.
 26. Lee, J. and Polin, R. (2003). Treatment and prevention of necrotizing enterocolitis. *Seminars in Neonatology*, 8(6), pp. 449–459.
 27. Lim, H. and Dey, S. (2009). HB-EGF: A unique mediator of embryo-uterine interactions during implantation. *Experimental Cell Research*, 315(4), pp. 619–626.
 28. Linnerbauer, M., Löblein, L., Vandrey, O., Peter, A., Han, Y., Tsaktanis, T., Wogram, E., Needhamsen, M., Kular, L., Nagel, L., Zissler, J., Andert, M., Meszaros, L., Hanspach, J., Zuber, F., Naumann, U., Diebold, M., Wheeler, M., Beyer, T. and Nirschl, L. (2024). The astrocyte-produced growth factor HB-EGF limits autoimmune CNS pathology. *Nature Immunology*, 25(3), pp. 432–447.
 29. Liu, J., Rich, C., Buczek-Thomas, J., Nugent, M., Panchenko, M. and Foster, J. (2003). Heparin-binding EGF-like growth factor regulates elastin and FGF-2 expression in pulmonary fibroblasts. *American Journal of Physiology-lung Cellular and Molecular Physiology*, 285(5), pp. 1106–1115.
 30. Manoilov, K., Labyntsev, A., Korotkevych, N., Kolibo, D. and Komisarenko, S. (2016). Interaction of recombinant diphtheria toxoids with cellular receptors in vitro. *DOAJ (DOAJ: Directory of Open Access Journals)*, 7(78), pp. 48–55.
 31. Mekada, E. and Uchida, T. (1985). Binding properties of diphtheria toxin to cells are altered by mutation in the fragment A domain. *Journal of biological chemistry*, 260(22), pp. 12148–12153.
 32. Michalopoulos, G. (2007). Liver regeneration. *Journal of Cellular Physiology*, 213(2), pp. 286–300.
 33. Michalsky, M., Lara-Marquez, M., Chun, L. and Besner, G. (2002). Heparin-binding EGF-like growth factor is present in human amniotic fluid and breast milk. *Journal of Pediatric Surgery*, 37(1), pp. 1–6.

34. Mitchell, C., Nivison, M., Jackson, L., Fox, R., Lee, D., Campbell, J. and Fausto, N. (2004). Heparin-binding epidermal growth factor-like growth factor links hepatocyte priming with cell cycle progression during liver regeneration. *Journal of Biological Chemistry*, 280(4), pp. 2562–2568.
35. Murayama, N., Nakamura, T., Saeki, M., Soyama, A., Saito, Y., Sai, K., Ishida, S., Nakajima, O., Itoda, M., Ohno, Y., Ozawa, S. and Sawada, J. (2002). CYP3A4 Gene Polymorphisms Influence Testosterone 6 β -hydroxylation. *Drug Metabolism and Pharmacokinetics*, 17(2), pp. 150–156.
36. Nanba, D., Toki, F. and Higashiyama, S. (2004). Roles of charged amino acid residues in the cytoplasmic domain of proHB-EGF. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 320(2), pp. 376–382.
37. Nankervis, C., Dunaway, D. and Nowicki, P. (2001). Determinants of terminal mesenteric artery resistance during the first postnatal month. *American journal of physiology. Gastrointestinal and liver physiology/American journal of physiology: Gastrointestinal and liver physiology*, 280(4), pp. 678–686.
38. Nishi, E., Shigeki, H. and Klagsbrun, M. (2003). Heparin-binding epidermal growth factor-like growth factor (HB-EGF). In: L. Henry, W. Norman, ed. *Encyclopedia of Hormones*. Cambridge: Academic Press. pp. 235–241.
39. Oyagi, A. and Hara, H. (2012). Essential Roles of Heparin-Binding Epidermal Growth Factor-Like Growth Factor in the Brain. *CNS Neuroscience & Therapeutics*, 18(10), pp. 803–810.
40. Oyagi, A., Moriguchi, S., Nitta, A., Murata, K., Oida, Y., Tsuruma, K., Shimazawa, M., Fukunaga, K. and Hara, H. (2011a). Heparin-binding EGF-like growth factor is required for synaptic plasticity and memory formation. *Brain Research*, 1419, pp. 97–104.
41. Oyagi, A., Morimoto, N., Hamanaka, J., Ishiguro, M., Tsuruma, K., Shimazawa, M. and Hara, H. (2011b). Forebrain specific heparin-binding epidermal growth factor-like growth factor knockout mice show exacerbated ischemia and reperfusion injury. *Neuroscience*, 185(21), pp. 116–124.

42. Paria, B., Elenius, K., Klagsbrun, M. and Dey, S. (1999). Heparin-binding EGF-like growth factor interacts with mouse blastocysts independently of ErbB1: a possible role for heparan sulfate proteoglycans and ErbB4 in blastocyst implantation. *Development*, 126(9), pp. 1997–2005.
43. Parnia, S., Hamilton, L., Puddicombe, S., Holgate, S., Frew, A. and Davies, D. (2014). Autocrine ligands of the epithelial growth factor receptor mediate inflammatory responses to diesel exhaust particles. *Respiratory Research*. 15(1), pp. 1–13.
44. Piao, Y., Iwakura, Y., Takei, N. and Nawa, H. (2005). Differential distributions of peptides in the epidermal growth factor family and phosphorylation of ErbB1 receptor in adult rat brain. *Neuroscience letters*, 390(1), pp. 21–24.
45. Pillai, S., Turman, M. and Besner, G. (1998a). Heparin-binding EGF-like growth factor is cytoprotective for intestinal epithelial cells exposed to hypoxia. *Journal of pediatric surgery*, 33(7), pp. 973–979.
46. Prygiel, M., Mosiej, E., Polak, M., Krysztopa-Grzybowska, K., Wdowiak, K., Formińska, K. and Zasada, A.A. (2024). Challenges of Diphtheria Toxin Detection. *Toxins*, 16(6), pp. 245.
47. Raab, G., Kover, K., Paria, B., Dey, S., Ezzell, R. and Klagsbrun, M. (1996). Mouse preimplantation blastocysts adhere to cells expressing the transmembrane form of heparin-binding EGF-like growth factor. *Development*, 122(2), pp. 637–645.
48. Radulescu, A., Zhang, H., Chen, C., Chen, Y., Zhou, Y., Yu, X., Otabor, I., Olson, J. and Besner, G. (2011). Heparin-binding egf-like growth factor promotes intestinal anastomotic healing. *Journal of surgical research*, 171(2), pp. 540–550.
49. Sanui, A., Yotsumoto, F., Tsujioka, H., Fukami, T., Horiuchi, S., Shirota, K., Yoshizato, T., Kawarabayashi, T., Kuroki, M. and Miyamoto, S. (2010). HB-EGF inhibition in combination with various anticancer agents enhances its antitumor effects in gastric cancer. *Anticancer Res.*, 30(8), pp. 3143–3149.

50. Sherbet, G. (2011). The epidermal growth factor (EGF) family. *Growth Factors and Their Receptors in Cell Differentiation, Cancer and Cancer Therapy*, 4(8), pp. 173–198.
51. Shimura, T., Kataoka, H., Ogasawara, N., Kubota, E., Sasaki, M., Tanida, T. and Joh, T. (2008). Suppression of proHB-EGF carboxy-terminal fragment nuclear translocation: a new molecular target therapy for gastric cancer. *Clinical cancer research*, 14(12), pp. 3956–3965.
52. Shiomi, T., Boudreault, F., Padem, N., Higashiyama, S., Drazen, J. and Tschumperlin, D. (2011). Lysophosphatidic acid stimulates epidermal growth factor-family ectodomain shedding and paracrine signaling from human lung fibroblasts. *Wound Repair and Regeneration*, 19(2), pp. 229–240.
53. Stoll, S., Rittié, L., Johnson, J. and Elder, J. (2012). Heparin-binding EGF-like growth factor promotes epithelial-mesenchymal transition in human keratinocytes. *Invest. Dermatol.*, 132(9), pp. 2148–2157.
54. Su, Y., Yang, J. and Besner, G. (2013). HB-EGF promotes intestinal restitution by affecting integrin-extracellular matrix interactions and intercellular adhesions. *Growth Factors*, 31(1), pp. 39–55.
55. Thompson, S., Higashiyama, S., Wood, K., Pollitt, N., Damm, D., McEnroe, G., Garrick, B., Ashton, N., Lau, K. and Hancock, N. (1994). Characterization of sequences within heparin-binding EGF-like growth factor that mediate interaction with heparin. *Journal of biological chemistry*, 269(4), pp. 2541–2549.
56. Vovk, I., Didan A., Zhukova D., Dronko L., Rebriev A., Siromolot A. and Kolybo D. (2025). Production and in vitro evaluation of recombinant human rhHB-EGF for wound healing and targeted therapy. *Biotechnologia Acta*, 18(1), pp.55–66.
57. Xia, G., Martin, A.E. and Besner, G. (2003). Heparin-binding EGF-like growth factor downregulates expression of adhesion molecules and infiltration of inflammatory cells after intestinal ischemia/reperfusion injury. *Journal of pediatric surgery*, 38(3), pp. 434–439.

58. Yagi, H., Yotsumoto, F., Sonoda, K., Kuroki, M., Mekada, E. and Miyamoto, S. (2008). Synergistic anti-tumor effect of paclitaxel with CRM197, an inhibitor of HB-EGF, in ovarian cancer. *International journal of cancer*, 124(6), pp. 1429–1439.
59. Zhou, B., Fan, Y., Rao, J., Xu, Z., Liu, Y., Lu, L. and Li, G. (2015). Matrix metalloproteinases-9 deficiency impairs liver regeneration through epidermal growth factor receptor signaling in partial hepatectomy mice. *Journal of surgical research*, 197(1), pp. 201–209.