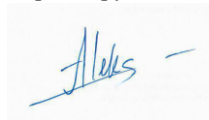


На правах рукописи



АЛЕКСЕЕВА ЛЮДМИЛА АЛЕКСАНДРОВНА

**МЕХАНИЗМ ПОДАВЛЕНИЯ ОПУХОЛЕВОЙ ПРОГРЕССИИ
ПОД ДЕЙСТВИЕМ ДНКазы I**

03.01.04 – биохимия

Автореферат
диссертации на соискание учёной степени
кандидата биологических наук

Новосибирск – 2020

Работа выполнена в Институте химической биологии и фундаментальной
медицины СО РАН

Научный руководитель:

Миронова Надежда Львовна, д.б.н.

Официальные оппоненты:

Митькевич Владимир Александрович, д.б.н.,

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки
Институт молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта Российской
академии наук ИМБ РАН, гл.н.с.

Трифонов Владимир Александрович, д.б.н.,

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки
Институт молекулярной и клеточной биологии СО РАН, зав.
лабораторией.

Рыкова Елена Юрьевна, д.б.н.,

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки
Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО
РАН, в.н.с.

Защита состоится « 25 » декабря 2020 г. в 10 часов
на заседании диссертационного совета ИХБФМ.03.01 при Институте
химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН по адресу:
630090, Новосибирск, просп. акад. Лаврентьева, 8

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Института химической
биологии и фундаментальной медицины СО РАН

С авторефератом можно ознакомиться на сайте www.niboch.nsc.ru

Автореферат разослан « 24 » _____ ноября _____ 2020 г.

Учёный секретарь диссертационного совета
к.х.н.,

Коваль В. В.



ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность проблемы. Наличие внеклеточных ДНК (внДНК) в плазме крови было впервые описано в работе Mandel и Métais в 1948 году. Однако данная работа не привлекла особого внимания исследователей вплоть до 1977 года, когда Stroun и Anker достаточно подробно описали циркулирующие внДНК плазмы крови некоторых высших организмов. Исследователями было выделено некое вещество, которое было устойчиво к действию РНКаз и протеаз, но гидролизовалось ДНКазой I на фрагменты с низкой молекулярной массой. При применении теста на выявление ДНК с пониженной стабильностью структуры, характерных для ДНК опухолевых клеток, оказалось, что часть внДНК в плазме крови онкологических больных была сходна по свойствам с ДНК опухолевого происхождения.

В настоящий момент накоплено большое количество данных о составе циркулирующих внДНК в крови высших организмов, но биологические функции внДНК до сих пор активно изучаются. В клинике предпринимаются попытки использовать характеристики внДНК для ранней диагностики различных заболеваний или для пренатальной диагностики. Для диагностики онкологических заболеваний используют методы выявления SNP-мутаций некоторых генов, в том числе протоонкогенов и онкосупрессоров, изменений в статусе метилирования ДНК, определение представленности фрагментов различных последовательностей и микросателлитов ДНК опухолевого происхождения, tandemных повторов и мобильных генетических элементов. Несмотря на успехи в поиске новых онкомаркеров на основе анализа SNP внДНК, низкая чувствительность методов и неудачи в применении разработанных маркеров для детекции онкологических заболеваний на ранних стадиях до сих пор значительно ограничивают клиническое применение такого анализа внДНК. Тем не менее, SNP-анализы фетальной внДНК используются в пренатальной диагностике. С другой стороны, повышенное содержание фрагментов микросателлитов, tandemных повторов и мобильных генетических элементов обычно выявляется в пуле внДНК уже на ранних стадиях развития как экспериментальных опухолей, так и различных опухолей у пациентов, в результате чего исследователи все чаще рассматривают эти последовательности как перспективные прогностические и диагностические инструменты в онкологии.

Тщательное исследование характеристик внДНК позволило поставить вопрос о возможной роли внДНК в канцерогенезе, что подтверждается некоторыми экспериментальными данными. В 1999 группой исследователей, возглавляемой García-Olmo, была выдвинута генометастатическая гипотеза. Согласно этой гипотезе, “метастазы могут возникнуть путем трансфекции уязвимых клеток, расположенных в органах-мишенях, опухолеспецифическими ДНК из клеток первичной опухоли, циркулирующими в плазме крови”. Эта гипотеза была принята другими авторами как модель, которая может объяснить противоречия в экспериментальных данных, касающихся метастазирования. В нескольких работах были получены доказательства, что внДНК опухолевого происхождения, в состав которой, в том числе, входят и фрагменты онкогенов, может вести себя подобно онковирусам, что открывает альтернативный путь метастазирования. Открытие ДНК-содержащих микровезикул и полученные доказательства горизонтального переноса ДНК для многих клеточных линий и организмов позволили укрепить эту гипотезу.

Открытие феномена нейтрофильных внеклеточных ловушек (NET) как особой сети, состоящей из внДНК с интегрированным в нее содержимым гранул нейтрофилов, изменило существующие концепции иммунологии. В 2003 году было обнаружено, что нейтрофилы и другие гранулоциты способны вместе с содержимым гранул выбрасывать собственный генетический материал во внеклеточное пространство с образованием особых ловушек, способных задерживать патогены. Неоднократно было замечено, что во многих случаях развитие опухоли и метастазирование сопровождается избыточным образованием NET, что не только ослабляет адгезию и усиливает инвазию, но и в некоторых случаях позволяет опухоли избежать иммунного надзора.

Принимая во внимание возможную патологическую роль внДНК в канцерогенезе, в настоящий момент ведутся разработки новых противоопухолевых и антиметастатических препаратов на основе дезоксирибонуклеаз. За последние 50 лет антиметастатический потенциал бычьей панкреатической ДНКазы I был неоднократно продемонстрирован различными группами исследователей как *in vitro*, так и *in vivo*. Кроме того, предпринимались попытки использовать ДНКазу I в качестве препарата для лечения больных с различными метастазирующими формами онкологических заболеваний, а с недавнего времени ведутся исследования человеческой рекомбинантной ДНКазы I (дорназы альфа).

Несмотря на то, что эти исследования носили фрагментарный характер, перспективность дальнейшего исследования ДНКазы I в качестве противоопухолевого агента и поиск ее мишеней, как возможных участников опухолевой прогрессии, не вызывает сомнений.

Целью настоящей работы являлось изучение антиметастатического потенциала ДНКазы I на примере бычьей панкреатической ДНКазы I на экспериментальных опухолевых моделях и поиск ее молекулярных мишеней среди циркулирующих внеклеточных ДНК.

Для достижения поставленной цели в работе решались следующие задачи:

1. Исследование влияния ДНКазы I на жизнеспособность и миграцию опухолевых клеток *in vitro*.
2. Исследование антиметастатического и противоопухолевого потенциала ДНКазы I на моделях метастазирующих опухолей мыши и поиск корреляций между уровнем циркулирующих внДНК и дезоксирибонуклеазной активностью сыворотки крови.
3. Поиск и валидация молекулярных мишеней ДНКазы I среди циркулирующих внДНК крови мышей с различными типами метастазирующих опухолей.
4. Изучение возможности межвидового переноса внДНК опухолевого происхождения мыши в клетки человека.
5. Сравнение противоопухолевой эффективности бычьей панкреатической ДНКазы I и рекомбинантного аналога ДНКазы I человека (Пульмозим™) *in vitro* и *in vivo*.

Научная новизна и практическая ценность работы. В данной работе впервые показано антиметастатическое действие бычьей панкреатической ДНКазы I на двух опухолевых моделях – меланоме B16 и лимфосаркоме RLS₄₀ мыши. Впервые продемонстрирована способность ДНКазы I подавлять рост первичного опухолевого

узла на моделях карциномы легких Льюис LLC и лимфосаркомы RLS₄₀. Впервые продемонстрирован антиметастатический потенциал рекомбинантной ДНКазы I человека (Пульмозим™) на модели меланомы B16.

Впервые показано, что при прогрессировании опухолей различного гистогенеза (карциномы легких Льюис, меланомы B16 и лимфосаркомы RLS₄₀) происходит значительное повышение представленности фрагментов онкогенов, tandemных повторов и мобильных генетических элементов среди циркулирующих вДНК крови. Впервые показано, что антиметастатическое и противоопухолевое действие ДНКазы I коррелирует с деградацией некоторых фрагментов вДНК в крови животных-опухоленосителей: фрагментов онкогенов *Hmga2*, *Myc*, *Jun* и фрагментов tandemных повторов, в частности SINE и LINE элементов. Впервые показано, что антиметастатическое действие рекомбинантной ДНКазы I человека (Пульмозим™) коррелирует с деградацией в кровотоке фрагментов SINE и LINE элементов.

Впервые показано, что фрагменты SINE и LINE элементов из крови мышей с карциномой легких Льюис LLC могут проникать в клетки человеческого происхождения, что свидетельствует о способности tandemных повторов участвовать в межвидовом переносе ДНК.

Положения, выносимые на защиту

1. Панкреатическая бычья ДНКазы I снижает жизнеспособность и миграционную активность опухолевых клеток *in vitro*, и уровень метастазирования и размер первичного опухолевого узла *in vivo*.

2. При развитии метастазирующих опухолей карциномы легких Льюис LLC, меланомы B16 и лимфосаркомы RLS₄₀ происходит повышение представленности tandemных повторов подсемейства B1 (SINE) и семейств L1 и Lx (LINE) в крови животных-опухоленосителей, а развитие карциномы легких Льюис также сопровождается увеличением представленности фрагментов онкогенов *Hmga2*, *Myc*, *Fos* и *Jun*.

3. Снижение инвазивного потенциала экспериментальных опухолей под действием панкреатической бычьей ДНКазы I сопровождается восстановлением дезоксирибонуклеазной активности крови до уровня здоровых животных.

4. Молекулярными мишенями панкреатической бычьей ДНКазы I среди циркулирующих вДНК являются фрагменты онкогенов *Hmga2*, *Myc* и *Jun* и около 200 типов tandemных повторов.

5. Снижение инвазивного потенциала экспериментальных опухолей различного гистогенеза под действием панкреатической бычьей ДНКазы I коррелирует со снижением представленности фрагментов SINE и LINE элементов в крови животных-опухоленосителей.

6. Возможен межвидовой перенос вДНК опухолевого происхождения мыши в клетки человека.

7. Рекомбинантная ДНКазы I человека (Пульмозим™) снижает инвазивный потенциал меланомы B16 как *in vitro*, так и *in vivo*. *In vivo* сокращение количества метастазов сопровождается снижением представленности фрагментов SINE и LINE элементов в крови животных-опухоленосителей.

Публикации и апробация работы. По материалам работы опубликовано 3 печатных работы в рецензируемых журналах, индексируемых в базах данных Web of

Science и SCOPUS. Результаты работы были представлены на 6 российских и международных конференциях.

Структура и объем работы. Диссертация состоит из введения, обзора литературы, экспериментальной части, результатов собственных исследований и их обсуждения, заключения, выводов и списка цитируемой литературы. Текст изложен на 158 страницах, иллюстрирован 32 рисунками, включает 15 таблиц, список литературы содержит 365 библиографических источников.

Вклад автора. Основная часть экспериментальной работы и анализ полученных данных выполнены лично автором. Работы с мышинными опухолевыми моделями выполнены совместно с к.б.н. Калединым В.И., к.м.н. Николиным В.П. (ИЦиГ СО РАН) и к.м.н. Сеньковой А.В. (ЛБНК, ИХБФМ СО РАН, Новосибирск).

Работы по конструированию ДНК библиотек были выполнены совместно к.б.н. Е.В. Бреннером. Секвенирование было проведено к.б.н. Бреннером Е.В. и Тупикиным А.Е на базе ЦКП «Геномика» (ИХБФМ СО РАН). Первичная обработка данных секвенирования была проведена к.б.н. Курильщиковым А. М. (ЛММ, ИХБФМ СО РАН, Новосибирск). Последующая обработка данных секвенирования была проведена автором работы совместно с к.б.н. Курильщиковым А.М.

СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

1. Изменение параметров опухолевых культур под действием бычьей панкреатической ДНКазы I *in vitro*

1.1 Линии опухолевых клеток, использованные в работе

В работе использовали три культуры опухолевых клеток мыши: суспензионную первичную культуру карциномы легких Льюис (LLC), суспензионную культуру лекарственно-устойчивой лимфосаркомы RLS₄₀ и культуру меланомы B16, растущую в виде монослоя.

1.2. Определение чувствительности клеток меланомы B16 к ДНКазе I

Клетки инкубировали в присутствии ДНКазы I в диапазоне концентраций $(1 - 20) \times 10^3$ ед.акт./мл без добавления FBS в стандартных условиях в течение 24 ч. Восприимчивость клеток к ДНКазе I определяли с помощью МТТ теста. Уже при концентрации ДНКазы I 5×10^3 ед.акт./мл жизнеспособность клеток B16 снижалась до 80%, а при наибольшей концентрации, 20×10^3 ед.акт./мл, выживаемость клеток составляла 25%. Значение IC₅₀ для ДНКазы I составило $(10.1 \pm 1.2) \times 10^3$ ед.акт./мл.

1.3. Влияние ДНКазы I на концентрацию вДНК на поверхности клеток LLC, B16 и RLS₄₀ и в культуральной среде

Клетки B16 (10^6 кл./мл), RLS₄₀ (5×10^5 кл./мл) и LLC (5×10^5 кл./мл) инкубировали в среде IMDM или DMEM с добавлением антибиотика и антимикотика без добавления FBS в течение 48 ч в присутствии ДНКазы I в концентрации 0.05×10^3 ед.акт./мл, после чего собирали клетки и кондиционную среду после культивирования, выделяли вДНК из культуральной среды (5 мл) и с поверхности опухолевых клеток (таб. 1).

Инкубация клеток LLC и B16 в присутствии ДНКазы I приводила к 2- и 10-кратному снижению вДНК в культуральной жидкости для B16 и LLC, соответственно, и практически полному исчезновению вДНК, связанной с

поверхностью этих клеток (таб. 1). Инкубация клеток RLS₄₀ в присутствии ДНКазы I приводила к полному исчезновению внДНК на клеточной поверхности (<1 ± 0.5 нг/млн. кл.). При этом количество внДНК в культуральной среде снижалось лишь на 25%.

Таб. 1. Влияние ДНКазы I на концентрацию внДНК на поверхности опухолевых клеток и в культуральной среде.

Тип опухоли	Концентрация ДНК, нг/млн.кл.			
	в культуральной жидкости		на поверхности клеток	
	ДНКаза I			
	-	+	-	+
B16	64 ± 10	35 ± 5*	22 ± 2	2 ± 1*
LLC	92 ± 13	11 ± 2**	13 ± 2	2 ± 1*
RLS ₄₀	200 ± 11	166 ± 10	9 ± 1	<1 ± 0.5*

Данные представлены в виде MEAN ± SE. * – достоверные отличия, $p < 0.05$; ** – достоверные отличия, $p < 0.001$.

1.4. Влияние ДНКазы I на миграционную активность опухолевых клеток B16

Влияние ДНКазы I на миграционную активность опухолевых клеток исследовали на примере клеток меланомы B16 *in vitro* с помощью метода зарастания царапины (“Scratch assay”). Целостность сформированного клетками монослоя нарушали нанесением царапины и измеряли скорость ее заполнения клетками в отсутствие (контроль) или в присутствии ДНКазы I в концентрации $(0.1 - 3.0) \times 10^3$ ед.акт./мл (рис. 1).

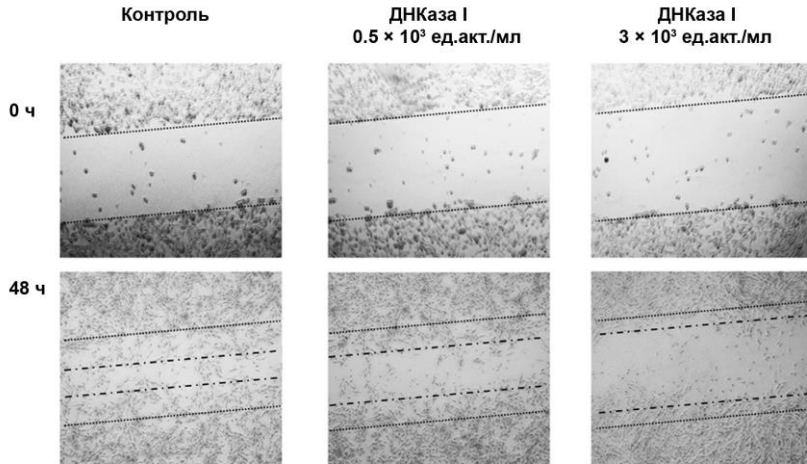


Рис. 1. Фотографические изображения заполнения царапины клетками B16 через 48 ч инкубации в присутствии ДНКазы I в концентрации 0.5 и 3.0×10^3 ед.акт./мл (4-х кратное увеличение). Прерывистой линией отмечены первоначальные границы царапины, пунктирной линией обозначены границы клеточного монослоя через 48 ч после нанесения повреждения.

ДНКазы I вызывала замедление миграции клеток пропорционально концентрации фермента, и при концентрации фермента 3.0×10^3 ед.акт./мл через 2 ч инкубации скорость зарастания царапины снижалась вдвое, а к 48 ч – падала в 5 раз (рис. 2). Токсический эффект ДНКазы I на клетки меланомы B16 был незначителен, поскольку используемые концентрации были значительно ниже IC_{50} .

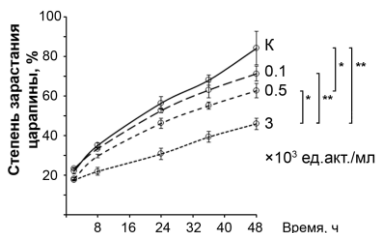


Рис. 2. Кинетика зарастания царапины клетками меланомы B16 в присутствии ДНКазы I. Клетки B16 культивировали в течение двух суток в присутствии ДНКазы I ($0.1 - 3.0 \times 10^3$ ед.акт./мл. Данные представлены в виде $MEAN \pm SE$. * $p < 0.05$, ** $p < 0.001$. К – контроль.

2. Исследование антиметастатического, противоопухолевого и иммуномодулирующего действия ДНКазы I *in vivo*

2.1. Опухолевые модели, использованные в работе

В работе использовали три типа опухолевых моделей: карциному легких Льюис (LLC), лекарственно-устойчивую лимфосаркому RLS_{40} и меланому B16. LLC и RLS_{40} при внутримышечном введении формируют первичный опухолевый узел и метастазируют в легкие и печень, соответственно. Меланома при внутривенном введении не формирует первичного опухолевого узла и метастазирует в легкие.

2.2. Исследование противоопухолевого и антиметастатического действия ДНКазы I при различных типах введения на модели LLC

Для определения наиболее эффективного способа введения ДНКазы I было проанализировано три метода – внутримышечное (в/м), внутрибрюшинное (в/б) и внутривенное (в/в). ДНКазу I вводили в дозе 0.12 мг/кг, что соответствует 1×10^3 ед.акт./кг, или 5 ед.акт./мышь (рис.3).

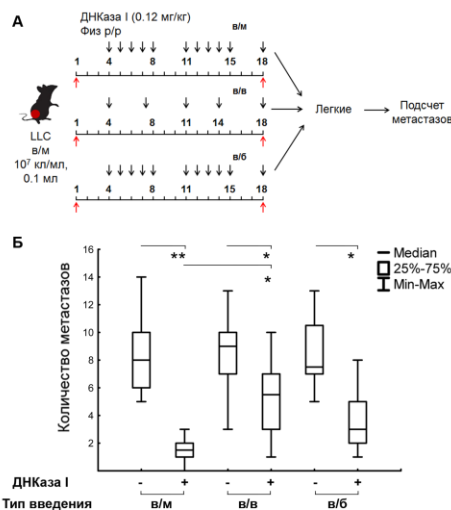


Рис. 3. Антиметастатическая активность ДНКазы I при разных типах введения. (А) Дизайн эксперимента. Клетки LLC имплантировали мышам C57Bl. Начиная с 4 дня после имплантации опухоли, животные получали ДНКазу I в дозе 0.12 мг/кг в/м, в/в или в/б. (Б) Количество метастазов в легких мышей C57Bl с LLC при разных типах введения ДНКазы I. Здесь и далее данные были статистически проанализированы с использованием однофакторного анализа ANOVA с апостериорным критерием Тьюки. * $p < 0.05$, ** $p < 0.001$.

Мышам C57Bl были в/м имплантированы клетки LLC, и, начиная с четвертого дня после имплантации опухоли, животные получали инъекции ДНКазы I в/м по схеме 5+2 (5 дней инъекции, 2 дня перерыв); в/в на 4, 7, 11, 14 и 18 дни; в/б по схеме 5+2 (рис. 3, А). В контрольных группах животные-опухоленосители получали инъекции физ./раствора. На 18 день эксперимента, через 1 час после последней инъекции животных выводили из эксперимента и определяли количество метастазов в легких мышей с LLC, получавших ДНКазу I с использованием различных методов введения (рис. 3, Б).

Наиболее высокое антиметастатическое действие наблюдалось при в/м способе введения ДНКазы I (рис. 3, Б): количество метастазов при в/м введении снижалось в 4 раза по сравнению с контролем, тогда как при в/б и в/в способе введения наблюдалось снижение в 2 и 3 раза, соответственно, по сравнению с контролем.

2.3. Противоопухолевое и антиметастатическое действие ДНКазы I на моделях опухолей B16 и RLS₄₀

Для оценки влияния ДНКазы I на инвазивный потенциал различных опухолей были выбраны модели меланомы B16 и лимфосаркомы RLS₄₀, а также LLC в качестве контрольной модели.

Клетки меланомы B16 имплантировали в/в (метастатическая модель), а клетки RLS₄₀ и LLC – в/м, и, начиная с четвертого дня после имплантации опухоли, животные получали: инъекции ДНКазы I (0.12 – 1.2 мг/кг) в/м по схеме 5+2 (рис. 4). На 15, 22 и 19 день развития опухолей LLC, B16 и RLS₄₀, соответственно, у мышей собирали кровь и готовили сыворотку.

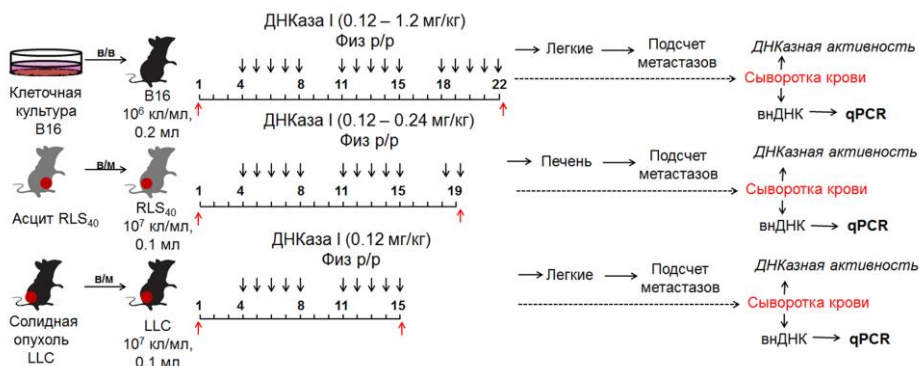


Рис. 4. Исследование противоопухолевого и антиметастатического действия ДНКазы I на моделях B16, LLC и RLS₄₀. Дизайн эксперимента.

Введение мышам с RLS₄₀ и LLC ДНКазы I в/м приводило к замедлению роста первичного опухолевого узла (рис. 5, А, Б): было обнаружено 2-кратное уменьшение объема опухоли для LLC ($3.1 \pm 0.4 \text{ см}^3$ в контроле vs $1.7 \pm 0.3 \text{ см}^3$ в экспериментальной группе) и 1.5-кратное снижение для RLS₄₀ ($2.4 \pm 0.2 \text{ см}^3$ vs $1.6 \pm 0.2 \text{ см}^3$). Индекс торможения роста опухоли (ТРО) составил 45% для мышей с LLC и 33% для мышей с RLS₄₀, соответственно. На модели RLS₄₀ увеличение дозы до 0.24 мг/кг привело к ингибированию роста опухоли в 2.5 раза.

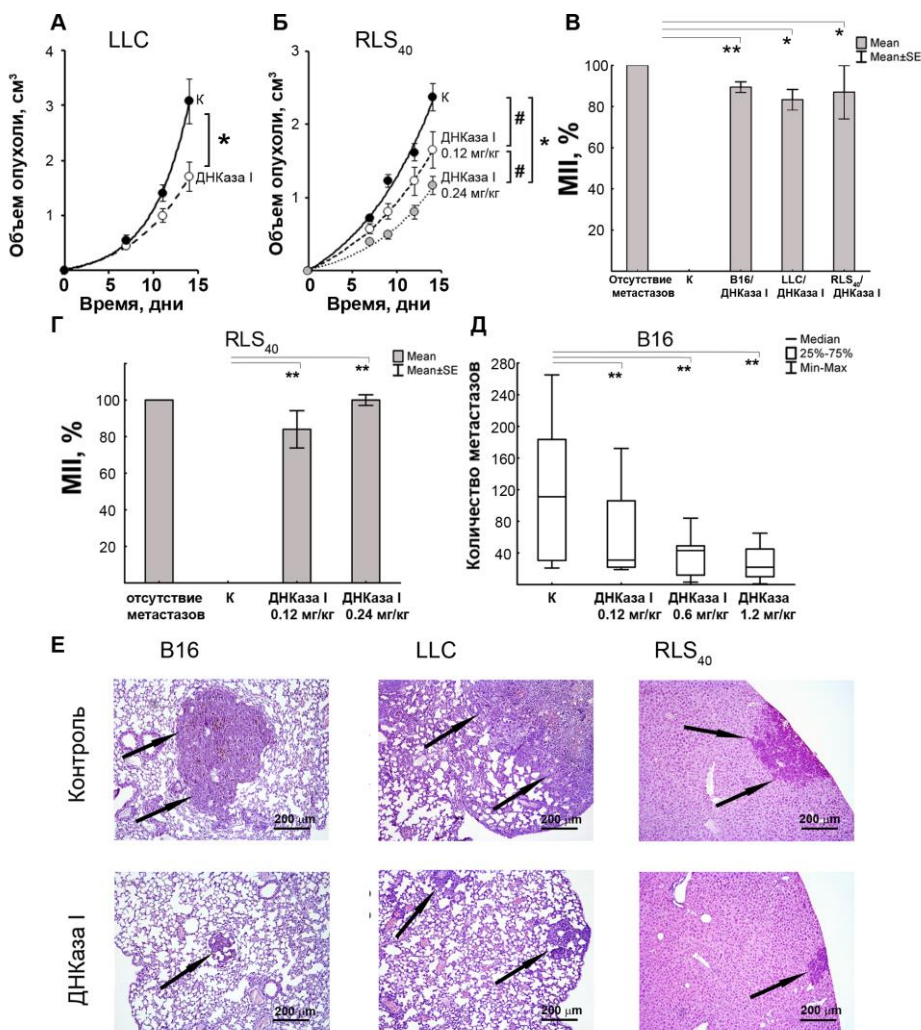


Рис. 5. Влияние ДНКазы I на рост первичной опухоли и метастазов у мышей с LLC, RLS₄₀ и B16. (А) и (Б) Влияние ДНКазы I на рост первичных опухолей LLC и RLS₄₀. К – мыши с опухолями, получавшие инъекции физ. раствора; ДНКазы I – мыши с опухолями, получающие ДНКазу I (0.12 – 0.24 мг/кг). (В) Индекс ингибирования метастазов (МИ) легких и печени групп мышей с B16, LLC и RLS₄₀, получавших инъекции физ./раствора (К) и ДНКазы I (0.12 мг/кг). Данные представлены в виде MEAN ± SE. * - достоверные отличия, $p < 0.05$, # – недостоверные отличия. (Г) Эффект дозы ДНКазы I на МИ в печени мышей CBA с RLS₄₀. (Д) Эффект дозы ДНКазы I на количество поверхностных метастазов в легких мышей C57Bl с B16. Данные представлены в виде медианы или MEAN ± SE. * - достоверные отличия, $p < 0.05$, ** - достоверные отличия, $p < 0.001$. (Е) Гистотопограммы срезов легких и печени групп мышей с B16, LLC и RLS₄₀, получавших инъекции физ./раствора (Контроль) и ДНКазы I (0.12 мг/кг). Окрасивание гематоксилином и эозином. Стрелками указаны метастазы. Шкала соответствует 200 мкм.

Введение ДНКазы I приводило к значительному снижению количества поверхностных метастазов в легких на модели метастатической меланомы B16, уменьшение площади внутренних метастазов в легких на моделях LLC и B16 и печени на модели RLS₄₀ по сравнению с контрольными животными (рис. 5, В,Е). Ингибирование развития метастазов оценивали путем подсчета индекса ингибирования метастазирования (МИ) с использованием морфометрического анализа. МИ контрольной группы принимали за 0%, а МИ, соответствующий 100%, указывал на отсутствие метастазов. После введения ДНКазы I было обнаружено 6-ти кратное уменьшение площади метастазов в легких у мышей с LLC, 7.7-кратное уменьшение площади метастазов в печени у мышей с RLS₄₀ и 9.4-кратное уменьшение площади метастазов в легких у мышей с метастатической меланомой B16 (рис. 5, В). Морфометрический анализ показал, что МИ у мышей с LLC, RLS₄₀ и меланомой B16, получавших ДНКазу I, были примерно одинаковыми и составили в среднем 83 – 89% (рис. 5, В).

У мышей с меланомой B16 без лечения среднее количество метастазов на поверхности легких составляло 117 ± 21 , в то время как у животных, получавших ДНКазу I (0.12 мг/кг), оно составляло 61 ± 11 . Увеличение дозы ДНКазы I до 0.6 мг/кг привело к снижению числа метастазов до 48 ± 10 , однако дальнейшее увеличение дозы до 1.2 мг/кг не привело к значительному усилению эффекта (35 ± 5 , рис. 5, Д). Удвоение дозы ДНКазы I на модели RLS₄₀ приводило к полному исчезновению у мышей-опухоленосителей метастазов в печени на модели RLS₄₀ (рис. 5, Г).

2.4. Влияние ДНКазы I на ДНКазную активность и концентрацию вДНК в сыворотке крови мышей с B16, LLC и RLS₄₀

Прогрессирование опухоли у мышей, получавших инъекции физ. раствора (контроль), приводило к двукратному увеличению концентрации вДНК в сыворотке крови животных с LLC и RLS₄₀ (таб. 2). Наиболее выраженное увеличение концентрации вДНК было обнаружено у мышей с B16; в этом случае уровень вДНК достиг 456 ± 82 нг/мл, что было в 5 – 6 раз выше по сравнению со здоровыми животными (таб. 2).

Таб. 2. Влияние ДНКазы I на концентрацию вДНК в сыворотке крови мышей с B16, LLC, RLS₄₀

Линия мышей	Концентрация вДНК, нг/мл	Тип опухоли	Концентрация вДНК, нг/мл	
	Здоровые мыши		Контроль	ДНКазы I
C57Bl	65 ± 10	B16	456 ± 82^{aa}	$246 \pm 22^{**}$
		LLC	138 ± 20^a	$97 \pm 16^*$
CBA	168 ± 32	RLS ₄₀	300 ± 91^a	292 ± 89

Контроль – мыши с опухолями, получавшие инъекции физ. раствора; ДНКазы I – мыши с опухолями, получавшие ДНКазу I (0.12 мг/кг). ^a – достоверные отличия между группами здоровых мышей и мышей-опухоленосителей без лечения, $p < 0.05$, ^{aa} – достоверные отличия, $p < 0.001$; * – достоверные отличия между группами мышей-опухоленосителей без лечения и получавших лечение ДНКазой I, $p < 0.05$, ** – достоверные отличия, $p < 0.001$.

Введение ДНКазы I (0.12 мг/кг) приводило к значительному снижению уровней вДНК в крови мышей с LLC (в 1.5 раза) и B16 (в 2 раза), но не в крови мышей с

RLS₄₀ (таб. 2). В группах мышей с B16, получавших ДНКазу I в дозах 0.6 и 1.2 мг/кг концентрации внДНК составили 92 ± 10 и 83 ± 6 нг/мл, соответственно, что близко к значениям у здоровых животных. В отличие от модели меланомы B16 в сыворотке крови мышей с RLS₄₀ не наблюдалось дозозависимого снижения концентрации внДНК, и при лечении ДНКазой I в разных дозах статистически значимых изменений в концентрации внДНК обнаружено не было.

Суммарную ДНКазную активность сыворотки крови здоровых мышей и мышей-опухоленосителей после лечения ДНКазой I и без него определяли в реакции расщепления модельной ДНК при 37°C и выражали в виде эффективных констант скорости расщепления ДНК (k_{eff}). ДНКазная активность сыворотки крови здоровых мышей линий C57Bl и CBA была примерно одинакова: $k_{\text{eff}} = (6.3 \pm 0.5) \times 10^{-4} \text{ с}^{-1}$, и $(6.2 \pm 1.2) \times 10^{-4} \text{ с}^{-1}$, соответственно. При прогрессировании меланомы B16 и LLC было отмечено двукратное снижение ДНКазной активности: $k_{\text{eff}} = (2.9 \pm 0.6) \times 10^{-4} \text{ с}^{-1}$ и $(2.8 \pm 1) \times 10^{-4} \text{ с}^{-1}$, соответственно (таб. 3), тогда как при прогрессировании RLS₄₀ было отмечено снижение ДНКазной активности в пять раз: $k_{\text{eff}} = (1.4 \pm 0.5) \times 10^{-4} \text{ с}^{-1}$.

Введение ДНКазы I в дозе 0.12 мг/кг приводило к двукратному повышению уровня ДНКазной активности для моделей LLC и B16 и трехкратному повышению для RLS₄₀ (таб. 3). Введение ДНКазы I мышам с B16 уже в дозе 0.12 мг/кг приводило к восстановлению ДНКазной активности сыворотки крови до уровня здоровых животных, аналогично животным с LLC (таб. 3). На модели RLS₄₀ повышение дозы ДНКазы I в два раза с 0.12 до 0.24 мг/кг приводило к значительному повышению ДНКазной активности ($k_{\text{eff}} = (4.8 \pm 0.8) \times 10^{-4} \text{ с}^{-1}$), что, однако, было ниже уровня здоровых животных.

Таб. 3. Влияние ДНКазы I на ДНКазную активность сыворотки крови мышей с B16, LLC, RLS₄₀

Линия мышей	ДНКазная активность, $k_{\text{eff}} \times 10^{-4} \text{ с}^{-1}$			
	Здоровые мыши	Тип опухоли	Контроль	ДНКазы I
C57Bl	6.3 ± 0.5	B16	$2.9 \pm 0.6^{\text{aa}}$	$5.5 \pm 0.4^{**}$
		LLC	$2.8 \pm 1^{\text{aa}}$	$6.6 \pm 2.5^{**}$
CBA	6.2 ± 0.5	RLS ₄₀	$1.4 \pm 0.5^{\text{aa}}$	$3.3 \pm 1.1^*$

Контроль – мыши с опухолями, получавшие инъекции физ. раствора; ДНКазы I – мыши с опухолями, получавшие ДНКазу I (0.12 мг/кг). ^а – достоверные отличия между группами здоровых мышей и мышей-опухоленосителей без лечения, $p < 0.05$, ^{aa} – достоверные отличия, $p < 0.001$; * – достоверные отличия между группами мышей-опухоленосителей без лечения и получавших лечение ДНКазой I, $p < 0.05$, ** – достоверные отличия, $p < 0.001$.

2.5. Влияние ДНКазы I на морфофункциональное состояние органов иммунной системы мышей с меланомой B16

Для оценки влияния ДНКазы I на морфофункциональное состояние органов иммунной системы (селезенки, тимуса) мышей с меланомой B16 было проведено морфологическое и морфометрическое исследование гистологических срезов этих органов. Селезенка мышей с меланомой B16, получавших инъекции физиологического раствора (контрольная группа), имела типичное строение (рис. 6, А). После введения ДНКазы I в дозе 1.2 мг/кг в селезенке обнаружили признаки значительной антигенной стимуляции: увеличение размеров и числа

фолликулов, их слияние между собой, появление в фолликулах герминативных центров (рис. 6, Б). При морфометрическом исследовании было выявлено, что введение ДНКазы I приводило к увеличению объемной плотности белой пульпы и диаметра лимфоидных фолликулов селезенки у мышей с меланомой B16 по сравнению с контрольными животными в 2 и 1.9 раз, соответственно.

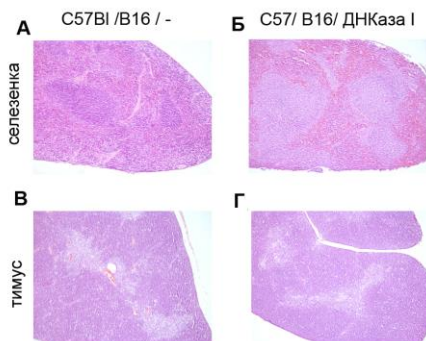


Рис. 6. Морфологические изменения в селезенке и тимусе мышей с меланомой B16 без лечения (А, В) и при введении ДНКазы I в дозе 1.2 мг/кг (Б, Г). Окраска гематоксилином и эозином; увеличение $\times 100$.

В тимусе мышей с меланомой B16, получавших инъекции ДНКазы I в дозе 1.2 мг/кг, также были найдены признаки антигенной стимуляции (рис. 6, Г). Выявлено, что лечение ДНКазой I приводило к нарастанию объемной плотности коркового вещества и уменьшению объемной плотности мозгового вещества тимуса соответственно в 1.2 и 2 раза по сравнению с контрольной группой. Корово-мозговой индекс (КМИ) – возрастал в 3.1 раза у мышей с меланомой B16, получавших ДНКазу I, по сравнению с контролем (с 2.3 ± 0.1 до 7.1 ± 1.3).

3. Поиск молекулярных мишеней ДНКазы I среди вДНК сыворотки крови на модели карциномы легких Льюис

3.1 Дизайн эксперимента и приготовление ДНК-библиотек

Для идентификации возможных молекулярных мишеней ДНКазы I среди циркулирующих вДНК был проанализирован профиль вДНК сыворотки крови мышей с LLC после лечения ДНКазой I методом массового параллельного секвенирования на платформе SOLiD 5.500. Для этого были сконструированы ДНК-библиотеки из вДНК, полученных из крови здоровых животных (L_{H1} и L_{H2}), животных с LLC, получавших инъекции физ. раствора (L_{LLC}) и животных с LLC, получавших инъекции ДНКазы I (L_D) (рис. 7).

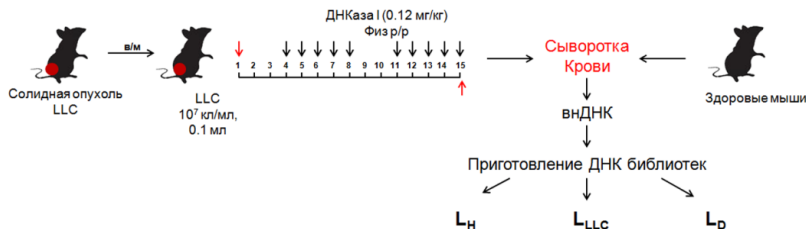


Рис. 7. Схема эксперимента для получения библиотек вДНК. Клетки LLC (10^7 кл./мл, 0.1 мл) имплантировали в/м мышам C57Bl. Начиная с 4-го дня после имплантации опухоли, животные получали в/м физ./раствор или ДНКазу I (0.12 мг/кг).

ВнДНК выделяли из объединенных образцов сыворотки (образцы от 6 мышей каждой группы). ДНК библиотеки конструировали по модифицированному протоколу ABS SOLiD™ Fragment Library Construction (рис. 8). Стартовое количество ДНК перед этапом I составило 230 ± 15 нг (L_H), 244 ± 22 нг (L_{LLC}) и 220 ± 17 нг (L_D).

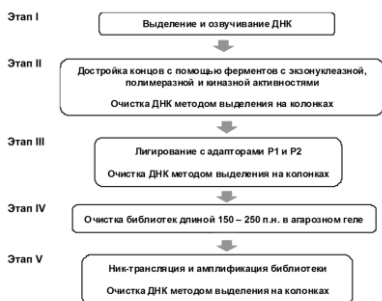


Рис. 8. Схема конструирования ДНК-библиотек.

На этапе I внДНК озвучивали, на этапах II и III концы молекул озвученной внДНК достраивали и лигировали с помощью двуцепочечных адапторов. После анализа в 1.5% LE-агарозе участок геля в области 150 – 250 п.н. вырезали, далее проводили ник-трансляцию и ПЦР. ДНК-библиотеки выделяли на колонках Qiagen. Выход составил 31.8 ± 5 нг (L_H), 54.8 ± 10 нг (L_{LLC}) и 10.2 ± 1.5 нг (L_D). Библиотеки анализировали методом массового параллельного секвенирования на платформе Solid 5.500.

3.2. Анализ данных секвенирования

Для каждой библиотеки внДНК было получено 55 – 67 млн прочтений. Степень картирования варьировала от 6.95% до 8.33%, что соответствует количеству прочтений от 3.8 до 5.6 млн.

По GC-составу профиль внДНК крови здоровых животных был приближен к профилю геномной ДНК. ВнДНК в библиотеке L_{LLC} характеризовалась присутствием 3×10^6 GC-обедненных последовательностей ($0 \pm 2\%$ от общего содержания), что в 3 – 6 раз больше, чем в библиотеках L_{H1} и L_{H2} . Введение ДНКазы I (L_D) приводило к снижению содержания GC-обедненных последовательностей до 1.0×10^6 последовательностей, что близко к содержанию этих последовательностей в пуле внДНК здоровых мышей.

Наиболее яркие различия между библиотеками наблюдались для tandemных повторов. В библиотеке L_{LLC} обнаружено 204 типа tandemных повторов с более высокой представленностью по сравнению с L_{H1} и L_{H2} , при этом представленность 46 типов повторов была в 2.5 ± 3 раза выше, по сравнению с L_{H1} и L_{H2} (рис. 9). Лечение ДНКазой I приводило к уменьшению количества tandemных повторов, которые были перепредставлены в L_{LLC} 1.5– 2.5 раза. В 30% случаев снижение количества повторов в L_D достигало уровня L_{H1} и L_{H2} .

Особое внимание было уделено повторам В-семейства и его подсемействам B1, B2, B3 и B4, имеющих высокую гомологию с ALU-повторами человека (SINE элементы). При развитии LLC представленность этих повторов в составе внДНК увеличивалась в два раза по сравнению с внДНК здоровых мышей (7.5×10^3 RPM в L_{LLC} и 3.4×10^3 RPM в L_H), а введение ДНКазы I приводило к снижению на 20% (до 6.1×10^3 RPM в L_D). Для подсемейства B1, имеющего максимальную гомологию с ALU повторами, наблюдалось двукратное их повышение в L_{LLC} по сравнению здоровыми животными (4×10^3 RPM в L_{LLC} и 2×10^3 RPM в L_H) и снижение в L_D до уровня здоровых животных (2×10^3 RPM в L_D). Аналогичное воздействие ДНКазы I

оказала на перераспределение фрагментов семейства L1 и других повторов, относящихся к LINE элементам.

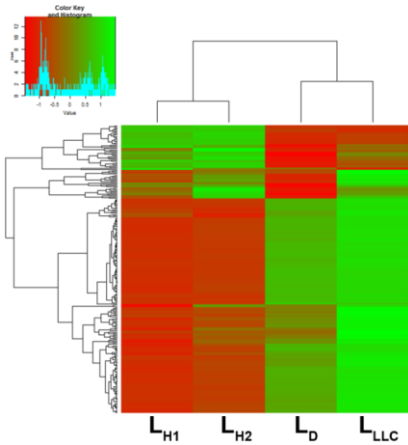


Рис. 9. Тепловая карта представленности tandemных повторов в ДНК-библиотеках L_{H1}, L_{H2}, L_{LLC} и L_D. Повышение и снижение представленности уровня tandemных повторов показано диапазоном красного и зеленого цветов, соответственно. Дендрограммы были получены с помощью кластеризации tandemных повторов или образцов с использованием Евклидовых расстояний между нормированными логарифмическими величинами RPM (Colour Key), соответственно. RPM – количество фрагмент-специфичных прочтений на млн прочтений в библиотеке.

Чтобы найти возможные молекулярные мишени ДНКазы I среди онкогенов, был проведен анализ генов *Hmga2*, *Fos*, *Myc*, *N-ras* и *Jun* (таб. 4). При развитии LLC количество *Myc*-фрагментов возросло в 15 раз, а количество специфичных для *Hmga2*, *Fos* и *Jun* фрагментов увеличилось в два-три раза по сравнению со здоровыми животными, тогда как количество специфичных для *N-ras* фрагментов не изменялось (таб. 4). После введения ДНКазы I наблюдалось снижение количества фрагментов *Myc*, *Hmga2* и *Jun* в 1.5 – 2 раза. Уровень *Hmga2* фрагментов падал до уровня здоровых животных. Содержание *Fos*-специфичных фрагментов увеличивалось, но статистически недостоверно (таб. 4).

Таб. 4. Представленность фрагментов, онкогенов *Hmga2*, *Fos*, *Myc*, *N-ras* и *Jun* в ДНК библиотеках

Онкогены	Представленность, RPM			
	L _{LLC}	L _D	L _H	
			L _{H1}	L _{H2}
<i>Hmga2</i>	1.90	1.35	1.27	0.82
<i>Fos</i>	2.74	2.93	0.95	0.84
<i>Myc</i>	86.14	73.38	6.40	3.62
<i>N-ras</i>	1.14	1.39	1.25	0.97
<i>Jun</i>	2.16	1.39	0.90	0.62

4. Исследование роли SINE и LINE элементов как возможных маркеров опухолевой прогрессии и их связи с метастазированием

4.1. Анализ представленности повторов SINE и LINE элементов в крови мышей с различными типами опухолей

Для анализа были выбраны четыре SINE и четыре LINE элемента, хорошо представленные в пуле вДНК по данным секвенирования, уровень которых значительно увеличивался при прогрессии LLC и падал после лечения ДНКазой I. Четыре типа повторов принадлежат подсемейству B1 (B1_Mm, B1_mur4, B1_mus1 и

B1_mus2), три типа повторов принадлежат подсемейству L1 (L1_mus 1, L1Md_F и L1Md_Gf), один тип принадлежит подсемейству Lx (Lx2_mus 1).

Для того чтобы выяснить влияние ДНКазы I на представленность тандемных повторов, относящихся к SINE и LINE элементам, мышам были имплантированы клетки опухолей B16, LLC и RLS₄₀. Лечение ДНКазой I проводилось согласно схемам на рис. 4. Уровни фрагментов SINE и LINE в образцах вндНК определяли с помощью qПЦР. На рис. 10 и 11 представлены данные для двух типов повторов L1_mus1 и B1_mus1; для остальных типов повторов были характерны те же тенденции представленности в пуле мышей-опухоленосителей получавших лечение ДНКазой I и без него.

Содержание повторов SINE и LINE во вндНК здоровых мышей было низким и варьировало в зависимости от линии мыши, но не превышало 0.05 – 0.08 а.у (рис. 10 и 11). Развитие опухолей B16 и LLC сопровождалось значительным увеличением представленности SINE и LINE. В случае опухоли B16 уровень фрагментов SINE возрастал в 3 – 4 раза, а уровень элементов LINE - в 3 – 3.5 раза (рис. 10, панель B16). Развитие LLC приводило к увеличению уровня элементов SINE в 3.5 – 5 раз, в то время как уровень LINE возрастал в 3 – 12 раз. Развитие RLS₄₀ также сопровождалось повышением уровня элементов SINE и LINE в 2 раза, тем не менее, уровень оставался довольно низким и достигал максимума в 0.4 а.у. для SINE элементов.

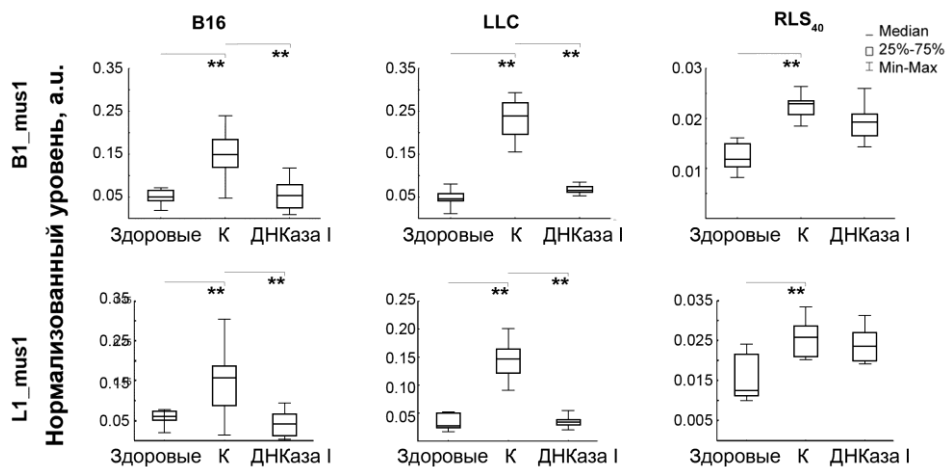


Рис. 10. Уровень SINE (B1_mus1) и LINE элементов (L1_mus1) во вндНК сыворотки крови здоровых мышей, мышей с B16, LLC или RLS₄₀, получавших инъекции физ. раствора или ДНКазы I (0.12 мг/кг). Данные qPCR. Представленность фрагментов приведена в виде условных единиц (а.у., arbitrary unit). * - достоверные отличия, $p < 0.05$, ** - достоверные отличия, $p < 0.001$. Здоровые – мыши без опухолей; К – мыши с опухолями, получавшие инъекции физ. раствора; ДНКаза I – мыши с опухолями, получавшие ДНКазу I.

Лечение ДНКазой I мышей с опухолями B16 и LLC приводило к снижению уровней повторов SINE и LINE до уровня, близкого к уровню здоровых животных (рис. 10). В случае мышей с RLS₄₀, мы наблюдали лишь тенденцию к уменьшению представленности SINE и LINE, но эти изменения были статистически незначимыми.

При повышении дозы ДНКазы I на моделях B16 и RLS₄₀ мы наблюдали дальнейшее статистически достоверное снижение представленности SINE и LINE элементов до уровня здоровых животных и ниже (рис. 11).

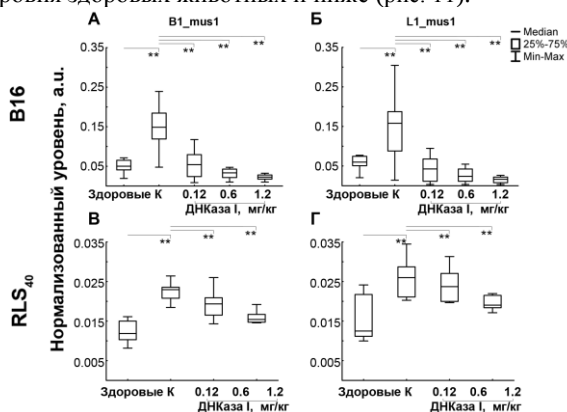


Рис. 11. Эффект дозы ДНКазы I на уровень SINE/LINE элементов в сыворотке крови мышей с B16 и RLS₄₀. Уровень циркулирующих элементов B1_mus1 и L1_mus1 для модели B16 (А, Б) и RLS₄₀. (В, Г). ** $p < 0.05$. Здоровые – мыши без опухолей; К – мыши с опухолями, получавшие физ. раствор; ДНКазы I – мыши с опухолями, получавшие ДНКазу I (0.12 – 1.2 мг/кг).

4.2. Исследование способности вДНК крови мышей с LLC проникать в клетки KB-3-1 человека

Для исследования способности гетерогенной вДНК, и, в частности, повторов SINE и LINE проникать в клетки, была использована линия клеток эпидермоидной карциномы человека KB-3-1 (рис. 12). На 15-й день эксперимента из сыворотки крови мышей разных групп выделяли вДНК и добавляли к клеткам KB-3-1 в количестве $100 \text{ нг}/10^5 \text{ кл.}$ и инкубировали в течение трех дней. В качестве отрицательного контроля использовались клетки KB-3-1, не обработанные вДНК. В качестве положительного контроля использовали клетки, обработанные вДНК разных групп животных после прекомплеобразования с Lipofectamine 2000. Клетки собирали, удаляли связанные с поверхностью вДНК, чтобы исключить их из анализа. Из клеток выделяли суммарную ДНК и определяли представленность повторов SINE и LINE элементами методом qPCR.

Было обнаружено, что обработка клеток KB-3-1 вДНК, полученной из сыворотки крови здоровых мышей, не приводила к увеличению представленности повторов SINE и LINE элементов в пуле суммарной ДНК клеток KB-3-1: уровни этих элементов мало отличались от уровней в интактных клетках KB-3-1 (рис. 12, В, Г). Обработка клеток вДНК, полученной из сыворотки крови мышей с LLC (контроль), приводила к 5-кратному увеличению представленности элементов B1_mus1, и 8-кратному повышению представленности L1_mus1 (рис. 12, В и Г). Обработка клеток KB-3-1 вДНК, полученной из сыворотки крови мышей с LLC, получавших инъекции ДНКазы I так же не приводила к достоверному повышению представленности повторов SINE и LINE в суммарной ДНК клеток KB-3-1.

После обработки клеток вДНК, полученной из сыворотки крови здоровых мышей и мышей, получавших инъекции ДНКазы I, в комплексе с Lipofectamine 2000 не было обнаружено достоверного возрастания концентрации ДНК. Обработка клеток KB-3-1 вДНК мышей с LLC в комплексе с Lipofectamine 2000 привела к возрастанию представленности элементов B1_mus1 в 50 раз и L1_mus1 в 12 раз (рис. 12, В и Г).

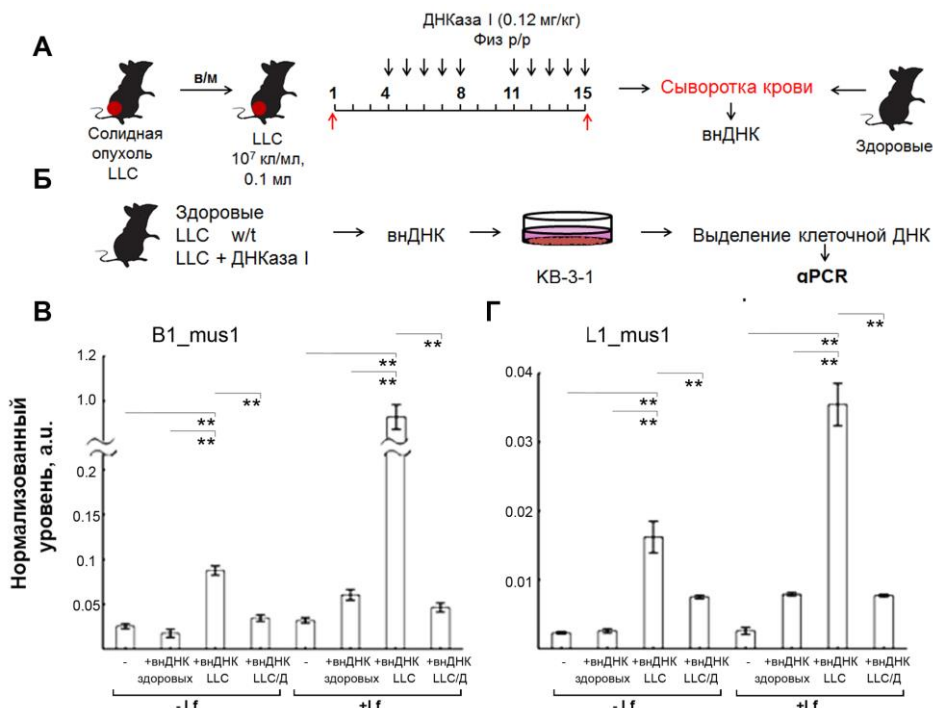


Рис. 12. Исследование способности SINE и LINE из внДНК, полученной из крови мышей с LLC, проникать в клетки KB-3-1 человека. (А) и (Б) Дизайн эксперимента. (В) Уровень элементов B1_mus1 в составе суммарной ДНК клеток KB-3-1. (Г) Уровень элементов L1_mus1 в составе суммарной ДНК клеток KB-3-1. Данные представлены как MEAN $\pm$ SE. Различия считали достоверными при $p < 0.05$. – – интактные клетки, внДНК здоровых – внДНК, выделенная из сыворотки крови здоровых животных; внДНК LLC – внДНК, выделенная из сыворотки крови мышей с LLC, получавших инъекции физ. раствора; внДНК LLC/Д – внДНК, выделенная из сыворотки крови мышей с LLC, получавших инъекции ДНКазы I в дозе 0.12 мг/кг; -Lf – внДНК без Lipofectamine 2000, +Lf – внДНК в комплексе с Lipofectamine 2000.

5. Исследование антиметастатического и противоопухолевого действия препарата Пульмозим™ *in vitro* и *in vivo*

Препарат Пульмозим™, содержащий дорназу α (человеческую рекомбинантную ДНКазу I), является коммерчески доступным препаратом, лицензированным для лечения редких заболеваний дыхательных путей в качестве отхаркивающего и муколитического средства. Учитывая доказанную клиническую эффективность препарата в разрушении внДНК, представлялось интересным оценить влияние Пульмозима™ на внДНК крови у мышей с метастатическими моделями опухолей, а также оценить потенциальное антиметастатическое или противоопухолевое действие Пульмозима™.

5.1. Определение ДНКазной активности и цитотоксичности препарата Пульмозим™ *in vitro*

ДНКазную активность определяли в реакции расщепления плазмиды pMDR670 и рассчитывали эффективные константы скорости расщепления, по формуле $P_t = P_{\infty} \times (1 - \exp^{-k_{\text{eff}} t})$. Было показано, что препарат Пульмозим™, содержащего рекомбинантную ДНКазу I человека, характеризуется такой же ДНКазной активностью, как и бычья панкреатическая ДНКазы I.

С помощью МТТ-теста была проведена оценка чувствительности клеток меланомы В16 к Пульмозиму. При использовании препарата в диапазоне концентраций $0.1 - 0.5 \times 10^3$ ед. акт./мл жизнеспособность клеток В16 достоверно не снижалась и составляла 90 – 100%. При повышении концентрации препарата до 0.75×10^3 ед. акт./мл жизнеспособность клеток снижалась лишь до 80%. Для Пульмозима™ было вычислено значение IC_{20} – доза фермента, при которой гибнет 20% клеток меланомы В16, и это значение составило $(0.71 \pm 0.05) \times 10^3$ ед. акт./мл.

5.2. Влияние Пульмозима™ на миграционную активность опухолевых клеток В16

Влияние Пульмозима™ на миграционную активность клеток меланомы В16 исследовали с помощью метода зарастания царапины. Целостность сформированного клетками монослоя нарушали нанесением царапины и отслеживали скорость ее заполнения опухолевыми клетками в отсутствие препарата (контроль) и в присутствии Пульмозима™ в концентрации $(0.1 - 0.5) \times 10^3$ ед. акт./мл (рис. 13).

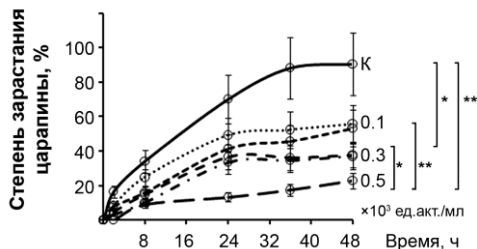


Рис. 13. Кинетика зарастания царапины клетками меланомы В16 в присутствии Пульмозима™. Клетки В16 культивировали в течение двух суток в присутствии Пульмозима™ в концентрации $(0.1 - 0.5) \times 10^3$ ед. акт./мл. Данные представлены в виде $MEAN \pm SE$. * – достоверные отличия, $p < 0.05$, ** – достоверные отличия, $p < 0.001$.

При анализе миграционной активности клеток было выявлено, что в через 48 ч присутствии Пульмозима™ происходит снижение скорости миграции клеток в 4 раза при использовании препарата в наибольшей концентрации (рис. 13).

5.3. Антиметастатическое действие Пульмозима™ на модели меланомы В16.

Для оценки влияния Пульмозима™ на инвазивный потенциал опухоли была выбрана метастатическая модель меланомы В16 (рис. 14, А). В качестве положительного контроля наличия антиметастатического эффекта была взята ДНКазы I в дозе 1.2 мг/кг.

Клетки меланомы В16 имплантировали в/в мышам, и, начиная с четвертого дня после имплантации опухоли, животные получали в/м либо физ./раствор, ДНКазу I (1.2 мг/кг), либо Пульмозим™ (1 – 10 мг/кг, или $1 - 10 \times 10^3$ ед. акт./кг, или 5 – 50 ед. акт./мышь) по схеме 5+2. По окончании эксперимента подсчитывали число поверхностных метастазов в легких и забирали кровь для анализа qPCR.

Было обнаружено, что в/м введение мышам с В16 Пульмозима™ приводило к значительному сокращению количества поверхностных метастазов (рис. 14, Б): было

обнаружено 2-кратное сокращение количества метастазов под действием Пульмозима™ в дозе 2 мг/кг и 10 мг/кг и 10-кратное снижение числа метастазов при использовании как Пульмозима в дозе 20 мг/кг.

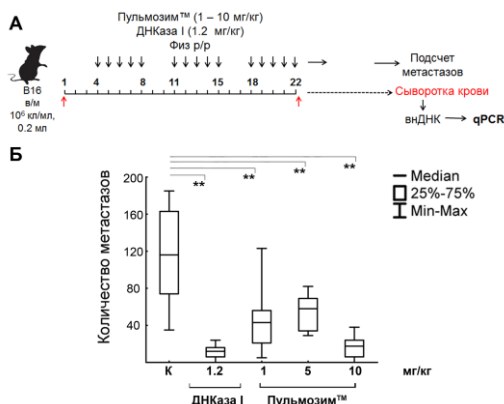


Рис. 14. Антиметастатическое действие Пульмозима™ на модели метастатической меланомы B16. (А) Схема эксперимента. Животные получали в/м физ./раствор, ДНКазы I (1.2 мг/кг) или Пульмозим™ (1 – 10 мг/кг) по схеме 5+2. (Б) Количество метастазов в легких мышей. Данные представлены в виде медианы. Различия считали достоверными при $p < 0.05$.

5.4. Действие Пульмозима™ на уровни SINE и LINE элементов в пуле вДНК.

Уровни фрагментов повторов SINE и LINE элементов в образцах вДНК определяли с помощью qПЦР (рис. 15).

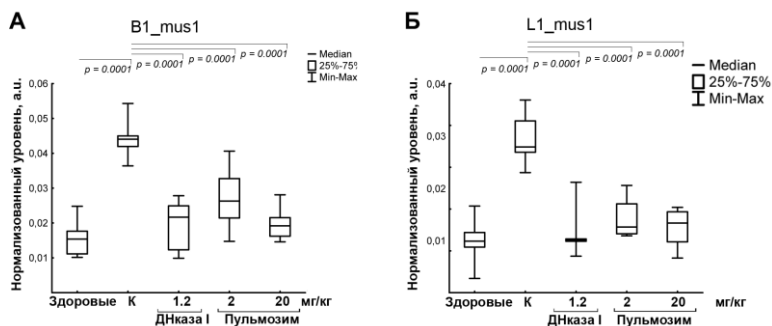


Рис. 15. (А) и (Б) Уровень SINE (B1_mus1) и LINE (L1_mus1) элементов во вДНК сыворотки крови здоровых мышей и мышей с B16, получавших в/м физ. раствор, ДНКазы I или Пульмозим™. Данные представлены в виде медианы. Различия считали достоверными при $p < 0.05$. Здоровые – мыши без опухолей; К – мыши с опухолями, получавшие инъекции физ./раствора; ДНКазы I – мыши с опухолями, получающие ДНКазы I (1.2 мг/кг), Пульмозим™ – мыши с опухолями, получающие Пульмозим™ (1 – 10 мг/кг)

Так же как и введение ДНКазы I, введение Пульмозима™ мышам с меланомой B16 приводило к снижению уровня как SINE, так и LINE элементов до уровня, близкого к уровню здоровых животных (рис. 15). При лечении препаратом в дозе 1 мг/кг наблюдалось снижение представленности SINE элементов во вДНК в 2 раза, в случае LINE элементов было показано снижение представленности в 2 – 3 раза (рис. 15, А, Б). Повышение дозы Пульмозима™ в 10 раз не приводило к достоверному усилению эффекта.

6 Заключение

В данной работе впервые был показан антиметастатический потенциал бычьей панкреатической ДНКазы I на двух опухолевых моделях – меланоме B16 и лимфосаркоме RLS₄₀ и впервые была продемонстрирована способность ДНКазы I подавлять рост первичного опухолевого узла на таких экспериментальных опухолевых моделях, как карцинома легких Льюис и лимфосаркома RLS₄₀. Продemonстрировано снижение миграционной активности клеток меланомы *in vitro* под действием ДНКазы I, что и объясняет высокий антиметастатический эффект (до 70% ингибирования метастазов) на модели меланомы *in vivo*. На модели меланомы B16 впервые было показано, что ДНКазы I вызывает неспецифическую активацию иммунной системы, что позволяет предположить, что иммуностимулирующее действие ДНКазы I может вносить вклад в наблюдаемый антиметастатический эффект. Впервые показана способность рекомбинантной ДНКазы I человека (ПульмозимTM), коммерчески доступного лекарственного препарата для лечения муковисцидоза, успешно подавлять инвазивный потенциал меланомы B16 *in vitro* и вызывать выраженный антиметастатический эффект в легких при в/м введении на модели меланомы B16 *in vivo*.

Было показано, что в/м введение ДНКазы I достоверно сокращает количество метастазов в легких и печени у мышей с различными метастатическими опухолями. На основе того, что снижение количества метастазов сопровождается снижением концентрации внДНК в кровотоке и повышением ДНКазной активности крови, мы предполагаем, что снижение уровня метастазирования LLC, B16 и RLS₄₀ под действием ДНКазы I в экспериментах *in vivo* может быть обусловлено неспецифической деградацией циркулирующих в кровотоке опухолевых внДНК.

Показано, что развитие карциномы легких Льюис, меланомы B16 и лимфосаркомы RLS₄₀ сопровождается как увеличением общей концентрации внДНК в крови мышей-опухоленосителей, так и увеличением уровня SINE и LINE элементов. Впервые было показано, что антиметастатическое действие ДНКазы I ассоциировано со снижением патологически повышенного уровня фрагментов циркулирующих внДНК крови, связанных с канцерогенезом (онкогенов *Hmga2*, *Мус* и *Jun*, tandemных повторов, SINE и LINE элементов). Доказано, что антиметастатическое действие рекомбинантной ДНКазы I человека на модели меланомы B16 мыши сопровождается снижением уровня SINE и LINE элементов среди циркулирующих внДНК крови.

Наши данные показывают, что SINE и LINE элементы из крови мышей с карциномой легких Льюис LLC могут захватываться клетками человеческого происхождения, что свидетельствует о способности tandemных повторов участвовать в межвидовом переносе ДНК.

В заключение можно предположить, SINE и LINE элементы могут использоваться в качестве универсальных маркеров канцерогенеза и, по всей видимости, играют важную роль в развитии метастазов.

Таким образом, ДНКазы I является перспективным объектом для исследований не только в качестве потенциального антиметастатического препарата для широкого спектра метастазирующих опухолей, но и как эффективный инструмент для поиска новых онкомаркеров-мишеней среди внДНК. ПульмозимTM, использующийся для лечения муковисцидоза, может быть предложен в качестве прототипа антиметастатического препарата для использования в клинике.

7 Выводы

В данной работе было проведено всестороннее исследование антиметастатического потенциала бычьей панкреатической ДНКазы I и рекомбинантной ДНКазы I человека (Пульмозим™) на экспериментальных метастатических опухолевых моделях.

1. Показано, что ДНКазы I практически не влияет на жизнеспособность клеток меланомы B16, но значительно снижает их миграционную активность *in vitro*.

2. Показано, что внутримышечное введение ДНКазы I мышам с меланомой B16, карциномой легких Льюис LLC и лимфосаркомой RLS₄₀ приводит к снижению количества и площади метастазов, а также замедлению роста первичного опухолевого узла. Показано, что снижение инвазивного потенциала опухолей под действием ДНКазы I коррелирует с повышением ДНКазной активности сыворотки крови до уровня здоровых животных.

3. Показано, что молекулярными мишенями ДНКазы I в крови животных с карциномой легких Льюис LLC являются фрагменты онкогенов *Hmga2*, *Мус* и *Jun* и около 200 типов тандемных повторов, включая повторы семейств B (SINE) и L1 (LINE), уровень которых повышается при развитии опухоли и снижается при введении ДНКазы I. Показано, что снижение инвазивного потенциала опухолей под действием ДНКазы I коррелирует со снижением представленности фрагментов SINE и LINE элементов в крови животных-опухоленосителей, что позволяет предложить SINE и LINE элементы в качестве новых онкомаркеров.

4. Показано, что SINE и LINE элементы из крови мышей с карциномой легких Льюис могут проникать в клетки эпидермоидной карциномы KB-3-1 человека, что свидетельствует о способности тандемных повторов участвовать в межвидовом переносе ДНК.

5. Показано, что рекомбинантная ДНКазы I человека (препарат Пульмозим™), так же как и бычья панкреатическая ДНКазы I, практически не влияет на жизнеспособность клеток B16, но снижает их миграционную активность. Показано, что Пульмозим™ снижает число и площадь метастазов на модели метастатической меланомы B16 мыши так же эффективно, как и ДНКазы I, и антиметастатическое действие Пульмозима™ коррелирует со снижением представленности фрагментов SINE и LINE элементов в крови животных-опухоленосителей.

Результаты диссертации опубликованы в работах:

1. Алексеева Л.А., Патутина О.А., Сенькова А.В., Зенкова М.А., Миронова Н.Л. Подавление инвазивных свойств меланомы мыши под действием бычьей панкреатической ДНКазы I *in vitro* и *in vivo*. Молекулярная биология. 2017. 51(4): 637-646.
2. Alekseeva L.A., Mironova N.L., Brenner E.V., Kurilshikov A.M., Patutina O.A., Zenkova M.A. Alteration of the exDNA profile in blood serum of LLC-bearing mice under the decrease of tumour invasion potential by bovine pancreatic DNase I treatment // PLoS One. –2017. – V. 12. – P. e0171988.
3. Alekseeva L.A., Sen'kova A.V., Zenkova M.A., Mironova N.L. Targeting circulating SINEs and LINEs with DNase I provides metastases inhibition in experimental tumor models // Mol Ther Nucleic Acids. – 2020. – V. 20. – P. 50–61. doi: 10.1016/j.omtn.2020.01.035.

Работа была выполнена при поддержке грантом РНФ №19-74-30011