

*На правах рукописи*



МАКЕЕВА АННА ВЛАДИМИРОВНА

**ОЦЕНКА ВЛИЯНИЯ РИБОНУКЛЕАЗЫ *BACILLUS PUMILUS*  
(БИНАЗЫ) НА ФУНКЦИОНАЛЬНУЮ АКТИВНОСТЬ МАКРОФАГОВ  
И НОРМОФЛОРЫ КИШЕЧНИКА**

03.02.03 – Микробиология

**АВТОРЕФЕРАТ**  
диссертации на соискание ученой степени  
кандидата биологических наук

Казань – 2019

Работа выполнена на кафедре микробиологии ФГАОУ ВО «Казанский (Приволжский) федеральный университет»

Научный руководитель: доктор биологических наук, профессор,  
зав. кафедрой микробиологии КФУ  
Ильинская Ольга Николаевна

Официальные оппоненты: Бывалов Андрей Анатольевич – доктор  
медицинских наук, профессор кафедры  
биотехнологии федерального государственного  
бюджетного образовательного учреждения  
высшего образования «Вятский  
государственный университет» (г. Киров)

Петрова Ольга Евгеньевна – кандидат  
биологических наук, старший научный  
сотрудник лаборатории молекулярной биологии  
Казанского института биохимии и биофизики –  
обособленного структурного подразделения  
Федерального исследовательского центра  
«Казанский научный центр Российской  
академии наук» (г. Казань)

Ведущая организация: Федеральное государственное бюджетное  
учреждение науки Институт цитологии  
Российской академии наук (г. Санкт-Петербург)

Защита диссертации состоится «06» июня 2019 г. в 11.00 на заседании  
диссертационного совета Д 212.081.36 при ФГАОУ ВО «Казанский  
(Приволжский) федеральный университет» по адресу: г. Казань, ул. Карла  
Маркса, д. 76, в аудитории 208 (актовый зал).

С диссертацией можно ознакомиться в научной библиотеке  
им. Н.И. Лобачевского при Казанском (Приволжском) федеральном  
университете.

Автореферат разослан «\_\_\_» \_\_\_\_\_ 2019 г.

Ученый секретарь диссертационного совета,  
доктор биологических наук

З.И. Абрамова

### **Актуальность проблемы и степень ее разработанности.**

Рибонуклеазы (РНказы) представляют собой ферменты класса гидролаз, катализирующие гидролиз фосфодиэфирных связей между нуклеозидами в РНК. Ранее РНказам приписывалась роль неспецифических деградирующих ферментов, однако теперь становится ясно, что они играют центральную роль в регуляции множества аспектов клеточного метаболизма РНК [Deutscher, Li, 2001]. Терапевтические свойства РНказ различного происхождения привлекают пристальное внимание со стороны ученых и медиков [Castro et al., 2016; Jordaan et al., 2018; Lee et al., 2008].

Среди данного класса ферментов наиболее перспективными являются бактериальные РНказы вследствие их резистентности к действию ингибитора РНказ, присутствующего в клетках и тканях млекопитающих. Биназа – гуанил-специфичная РНказа *Bacillus pumilis* (ранее – *Bacillus intermedius*, откуда происходит и тривиальное название фермента) образующая димер как в растворе, так и в естественных условиях биосинтеза и секреции [Dudkina et al., 2014], обладает антипролиферативной и апоптоз-индуцирующей активностью по отношению к широкому спектру опухолевых клеточных линий и противовирусной активностью [Garipov et al., 2014; Ilinskaya et al., 2007; Cabrera Fuentes et al., 2013; Ilinskaya, Shah Mahmud, 2014; Грибенча с соав., 2004].

Избирательная цитотоксичность РНказ по отношению к клеткам, экспрессирующим определенные онкогены, может быть использована для разработки препаратов РНказ в качестве средств целенаправленной терапии. Биназа проявляет избирательную цитотоксичность к клеткам, экспрессирующим онкогены *ras* [Ilinskaya et al., 2001], *kit* [Mitkevich et al., 2010a], *AML1-ETO* [Mitkevich et al., 2011], *TNF* [Mitkevich et al., 2013]. Для еще одной известной РНказы с противоопухолевой активностью – онконазы – выявлено ингибирующее действие на экспрессию генов клеток злокачественной мезотелиомы лёгких; угнетение экспрессии генов, влияющих на апоптоз, транскрипцию и иммунный ответ [Altomare et al., 2010]. Монотерапия онконазой мезотелиомы лёгких не принесла ожидаемых результатов, в связи с чем были начаты её клинические испытания в комплексе с антибиотиком доксорубицином, которые прошли III фазу [Porta et al., 2008]. Взаимодействие РНказ бактериального происхождения с известными средствами противоопухолевой терапии не сих пор остается неизученным.

Потенциал биназы как средства химиотерапии злокачественных новообразований ставит вопрос о ее биологических эффектах в отношении микрофлоры желудочно-кишечного тракта. [Wilson, Nicholson, 2009]. Недавние исследования показали, что низкие концентрации биназы могут оказывать стимулирующее действие на микроорганизмы, тогда как высокие концентрации фермента, лежащие в диапазоне 1 мг/мл, подавляют развитие бактерий [Kolpakov et al., 2012]. Хотя приведенные концентрации практически не действуют на рост бактерий, но в определенный момент могут приводить к изменениям различных жизненных параметров клеток.

Среди клеточных компонентов, способных откликаться на самые незначительные изменения окружающей среды, важную роль играют ферментные комплексы электрон-транспортных цепей, расположенные в цитоплазматической мембране бактерий [Beinert, Kiley, 1999]. ЭПР-спектроскопия позволяет охарактеризовать состояние подобных комплексов. С помощью данного метода осуществляется анализ качественных и количественных изменений парамагнитных центров, входящих в состав электрон-транспортных цепей, локализованных в цитоплазматической мембране прокариот и во внутренних мембранных структурах эукариотических клеток [Swartz et al., 2004].

Кишечная микрофлора не только влияет на биодоступность и абсорбцию веществ, поступающих с пищей, но и принимает непосредственное участие в регуляции функционирования иммунной системы [Belkaid *et al.*, 2014]. Иммунные реакции, возникающие в организме в ответ на действие лекарственных средств, способны внести значительный вклад в конечный результат терапии. Неспособность бионазы активировать CD4<sup>+</sup> и CD8<sup>+</sup> Т-клетки позволяет сделать вывод, что фермент не имеет свойств суперантигена и не индуцирует поликлональный иммунный ответ Т-клеток [Pinskaya *et al.*, 2007]. Однако до сих пор остается неясным, оказывает ли бионаза существенное влияние на макрофаги, которые представляют собой первую линию иммунной защиты [Van Der Bij, 2005].

В соответствии с вышеизложенным сформулирована цель и определены задачи настоящего исследования.

**Целью** настоящей работы стал анализ влияния бионазы – рибонуклеазы *Bacillus pumilus*, обладающей противоопухолевой активностью, на функциональную активность макрофагов и нормофлоры кишечника на примере *Escherichia coli*.

В соответствии с поставленной целью решались следующие **задачи**:

1. Охарактеризовать элементный состав клеток и качественный состав парамагнитных центров *E. coli* K12 в присутствии бионазы и РНКазы А при разных температурных режимах в отсутствие токсического действия РНКаз.
2. Определить уровень генерации активных форм кислорода клетками *E. coli* K12 при воздействии на них РНКаз.
3. Оценить экспрессию белков NF-κB сигнального пути (фосфо-NF-κB p65, NF-κB p65, NF-κB p100/p52) и белка-адаптера Toll-подобных рецепторов MyD88 в макрофагах мыши и человека под действием внеклеточных РНКаз и продуктов их гидролиза.
4. Проанализировать количественные изменения спектра цитокинов, синтезируемых макрофагами под действием внеклеточных РНКаз.
5. Выявить терапевтический потенциал низких концентраций бионазы в сочетании с противоопухолевым антибиотиком блеомицином по отношению к клеткам аденокарциномы легких человека.

**Научная новизна.** В ходе исследования был получен ряд новых данных, имеющих большое значение для развития фундаментальных и прикладных

аспектов современной биологической науки. С помощью метода ЭПР-спектроскопии впервые были зафиксированы изменения парамагнитных центров комменсального штамма желудочно-кишечного тракта *E. coli* K12 после обработки биназой в нетоксичных концентрациях. Зарегистрирован повышенный уровень интенсивности ЭПР-сигналов от железосодержащих белков и усиление сигнала сверхтонкой структуры двухвалентного марганца. С помощью спинового зонда зафиксировано двукратное повышение уровня активных форм кислорода в клетках, которое является следствием окислительного стресса, вызванного воздействием биназы. В настоящем исследовании было зарегистрировано увеличение содержания ряда таких переходных металлов, как марганец, железо, медь и цинк.

В работе впервые выявлено повышение уровня экспрессии компонента канонического NF-κB пути – фосфорилированной по серину-536 субъединицы p65 – в макрофагах человека и мыши при стимуляции биназой. Также мы показали, что биназа способна активировать периферические макрофаги мыши, усиливая синтез цитокинов IL-6, IL-10, MCP-1, TNF-α, не влияя на продукцию макрофагами противовоспалительного цитокина IL-10. Полученные в ходе исследования данные о профиле цитокинов и активации NF-κB сигнального пути свидетельствуют о способности биназы индуцировать макрофаги с провоспалительным фенотипом.

Впервые было охарактеризовано апоптозиндуцирующее и антипролиферативное действие антинеопластического агента блеомицина в сочетании с биназой. Показано, что одновременное использование биназы и блеомицина в максимальных концентрациях является неэффективным. С другой стороны, сочетание неапоптогенных концентраций биназы и блеомицина привело к повышенной по сравнению с индивидуальным действием исследуемых веществ доли апоптотических клеток в популяции.

### **Теоретическая и практическая значимость работы.**

Согласно данным Всемирной организации здравоохранения раковые заболевания являются второй ведущей причиной смертности во всем мире и в 2018 году привели к 9,6 миллиона смертей. В связи с этим поиск новых средств противоопухолевой терапии, а также новых способов элиминации раковых клеток в организме является одной из фундаментальных задач современной медицины и биологии. Настоящая работа важна тем, что в ней проведена комплексная оценка влияния перспективного цитотоксического в отношении малигнизированных клеток фермента биназы на механизмы клеточного ответа про- и эукариот. Расширение спектра модельных объектов, по отношению к которым охарактеризовано действие биназы, позволяет дать более точную оценку их селективности. В работе охарактеризованы качественные и количественные изменения в парамагнитных центрах клеток индикаторного штамма микрофлоры человека *E. coli* K12 и обоснована безопасность практического применения биназы, в том числе и как средства терапии рака различных отделов кишечника.

В работе впервые продемонстрирована перспективность применения низких концентраций биназы и противоопухолевого антибиотика

блеомицина в качестве компонентов сочетанной терапии. Сочетанная терапия имеет ряд преимуществ относительно монотерапии. Помимо отсутствия приобретенной устойчивости малигнизированных клеток к действию единственного компонента монотерапии, при сочетанной терапии возможно взаимовыгодное усиление действия двух различных терапевтиков.

Полученные нами результаты, свидетельствующие об отсутствии изменений жизнеспособности макрофагов после обработки биназой, а также данные о профиле синтезируемых цитокинов и активации канонического NF- $\kappa$ B сигнального пути в данном типе клеток подтверждают предположение о способности биназы индуцировать провоспалительный ответ со стороны иммунной системы, связанный с активацией M1 макрофагов, обладающих противоопухолевыми свойствами, что может внести положительный вклад в результат терапии.

#### **Основные положения, выносимые на защиту:**

1. Биназа в концентрациях, не обладающих токсическим и ростостимулирующим действием по отношению к клеткам прокариот, приводит к изменениям элементного состава клеток, функционального состояния и структуры ферментных комплексов электрон-транспортных цепей кишечных бактерий.

2. Биназа не оказывает влияния на жизнеспособность и пролиферацию макрофагов, но ведет к их активации по каноническому NF- $\kappa$ B сигнальному пути.

3. Биназа индуцирует провоспалительный и противоопухолевый иммунный ответ, повышая синтез провоспалительных и подавляя продукцию противовоспалительных цитокинов макрофагами.

4. Сочетанное действие биназы и противоопухолевого антибиотика блеомицина представляет собой перспективный терапевтический подход в лечении аденокарциномы легких ввиду взаимного усиления апоптоз-индуцирующего действия терапевтиков в низких концентрациях.

**Апробация работы.** Материалы диссертационной работы представлены на международных и региональных конференциях: всероссийская заочная научно-практическая конференция с международным участием «Микробиология в современной медицине» (Казань, 2013, 2014); I Международная школа-конференция студентов, аспирантов и молодых ученых «Биомедицина, материалы и технологии XXI века» (Казань, 2015); 19-ая Международная Пуцинская школа-конференция молодых ученых – «Биология Наука XXI века» (Пушино, 2015); Annual Scientific Meeting of the European Society for Clinical Investigation «Precision medicine for healthy ageing» (Barcelona, 2018), итоговых научных конференциях Казанского (Приволжского) федерального университета (Казань, 2014 – 2016).

**Место выполнения работы и личный вклад соискателя.** Диссертационная работа выполнена на кафедре микробиологии Института фундаментальной медицины и биологии Казанского (Приволжского) федерального университета. Основные направления исследования, его цель и задачи сформулированы совместно с научным руководителем. Анализ

данных литературы по теме диссертационной работы, лабораторные исследования и интерпретация полученных результатов проводились автором лично. Анализ элементного состава клеток проводился на Институте физики КФУ совместно с А.В. Волошиным. Определение жизнеспособности макрофагов и анализ спектра экспрессируемых белков были проведены автором лично в Институте биохимии Гиссенского университета им. Юстуса Либиха (Гиссен, Германия).

**Связь работы с научными программами.** Исследования выполнены в рамках Российской Правительственной Программы повышения конкурентоспособности Казанского федерального университета среди ведущих мировых научно-исследовательских центров и поддержаны проектами № 12-04-31022а Российского фонда фундаментальных исследований и № 14-14-00522 Российского научного фонда.

**Публикация исследования результатов.** По теме диссертации опубликовано 9 научных работ, среди них 4 статьи в рецензируемых научных журналах, рекомендованных ВАК Российской Федерации и включенных в глобальный индекс цитирования Scopus, одна из которых индексируется в базе данных Web of Science, и 5 тезисов на международных и российских конференциях.

**Структура и объем диссертации.** Диссертационная работа состоит из введения, обзора литературы, описания материалов и методов исследования, результатов, их обсуждения, заключения и списка цитируемой литературы. Работа изложена на 109 страницах машинописного текста, включает 1 таблицу, 18 рисунков. Библиография включает 188 наименований.

## **ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ**

**Ферменты.** Исследование проводили с использованием биназы – гуанил-специфичной РНКазы *B. pumilus* 3-19 дикого типа (ЕС 3.1.27.3, молекулярная масса 12.3 кДа, 109 аминокислотных остатков,  $pI = 9.5$ ), изолированной как гомогенный белок из культуральной жидкости нативного продуцента по методике, разработанной для секретируемых РНКаз бацилл [Dudkina *et al.*, 2014]. Также использовали панкреатическую РНКазу А быка (Вектор, Россия).

**Бактериальная культура.** В работе использовали стрептомицинустойчивый штамм *E. coli* K-12 (ВКПМ-3254). Культивирование *E. coli* K12 осуществляли на LB-бульоне в присутствии стрептомицина (100 мкг/мл) в течение 18 ч, затем культуру переносили в свежую питательную среду, инкубировали 24 ч в присутствии биназы (100 и 300 мкг/мл) и осаждали при 2600 g в течение 20 мин. Осадок ресуспендировали в натрий-фосфатном буфере (Sigma, США), концентрацию клеток доводили до  $3 \times 10^9$  КОЕ/мл и использовали для подготовки проб.

**Клеточные культуры.** Линия моноцитоподобных клеток человека THP-1 от пациента с острой моноцитарной лейкемией и линия макрофагов мыши RAW 264.7 получены из Американской коллекции типовых культур

(Rockville, США). Клетки THP-1 культивировали в среде RPMI 1640 с добавлением 10% эмбриональной бычьей сыворотки, 1% пенициллин-стрептомицина и 1% L-глутамина (Invitrogen, США) при 37°C во влажной атмосфере с 5% CO<sub>2</sub>. Клетки дифференцировали в макрофаги с использованием 2 мкг/мл фобол-12-миристан-13-ацетата (Sigma, США) в течение 48 часов. Макрофаги мыши RAW 264.7 культивировали в среде DMEM с высоким содержанием глюкозы, L-глутамина и NaPyr (Invitrogen, США) с добавлением 10% инактивированной эмбриональной бычьей сыворотки и высевали в 96-луночные или в 12-луночные планшеты в количестве  $1 \times 10^4$  или  $1 \times 10^5$  клеток/лунку. Макрофаги мыши RAW 264.7 активировали 30 ед./мл интерферона- $\gamma$  (Calbiochem, США) и 10 нг/мл липополисахарида (Sigma, США). Клетки линии A549, представляющие аденокарциному легких человека, приобретены в Американской коллекции клеточных культур (Роквилл, США). Клетки культивировали на питательной среде RPMI 1640 (Sigma, США), содержащей 10% эмбриональной сыворотки телят, 2мМ глутамина и 100 ед./мл пенициллина и стрептомицина во влажной атмосфере с 5% CO<sub>2</sub> при температуре 37°C. Клетки высевали в 6-луночные планшеты («GBO», Германия) и растили до достижения 50% конфлюэнтности после чего среду заменяли на новую, содержащую вещества в исследуемых концентрациях.

**Перитонеальные макрофаги.** Перитонеальные макрофаги получали с использованием мышей линии C57BL/6. Мышам вводили 3 мл тiogликолата (4%) (Sigma, США) в низ брюшной полости. По прошествии 72 ч был проведен перитонеальный лаваж. Для этого в брюшную полость вводили среду RPMI 1640 объемом 6 мл. Клетки, полученные после перитонеального лаважа, центрифугировали в течение 5 мин при 2000 g. Затем аккуратно удаляли надосадочную жидкость, осадок ресуспендировали в лизирующем эритроциты буфере (BioLegend, США), инкубировали при температуре 4°C в течение 5 мин, центрифугировали 5 мин при 2000 g. Супернатант удаляли и ресуспендировали в среде RPMI 1640 (Sigma, США), содержащей 5% эмбриональной телячьей сыворотки (HyClone, США). Макрофаги культивировали в среде RPMI 1640, содержащей 2 мМ глутамина (Sigma, США), 100 единиц/мл пенициллина и стрептомицина, 5% эмбриональной телячьей сыворотки, 0,1% фунгизона и 50 нг/мл макрофагального колониестимулирующего фактора (Sigma, США) при температуре 37°C во влажной атмосфере с 5% CO<sub>2</sub>.

**Цитофлуориметрический анализ жизнеспособности *E. coli* K12.** 18-часовую культуру *E. coli* K12 ресуспендировали в свежем LB-бульоне, содержащем биназу, либо без нее, до концентрации  $1 \times 10^6$  кл/мл, инкубировали 24 ч при 37°C. Затем клетки отмывали охлажденным натрий-фосфатным буфером (Sigma, США) и осуществляли цитофлуориметрический анализ с помощью проточного цитофлуориметра FACSCanto II (BD, США). Изменение жизнеспособности *E. coli* K12 под действием РНКаз определяли с помощью окрашивания йодидом пропидия (PI), согласно [Shi et al. 2007].



**ЭПР-характеристика парамагнитных центров в образцах клеток *E. coli* K12.** ЭПР-характеристика парамагнитных центров осуществляли с помощью стационарного спектрометра ESP-300 (Bruker, Германия) (рабочая частота 9,4-9,9 ГГц, напряженность магнитного поля 20-1600 мТ, погрешность – не более 0,01 мТ) при мощности СВЧ-излучения 2-20 мВт с частотой модуляции 100 кГц. В эксперименте использовали капилляры объемом 25 мкл (Sigma, США). В качестве контролей использовали надосадочную жидкость, натрий-фосфатный буфер и биомассу бактерий, выращенных на среде без добавления биназы. Для эксперимента готовили замороженные при 77К и лиофилизированные образцы. Лيوфилизацию проводили на сушке Martin Christ (Германия). Регистрацию спектров замороженных образцов проводили при 77К. Регистрацию спектров лиофилизированных образцов проводили с помощью гелиевого проточного криостата Oxford-9 (Великобритания) при 15К. Температуру контролировали с помощью прибора ITC 4 Oxford (Великобритания). Уровень генерации активных форм кислорода определяли с помощью спинового зонда с использованием циклического гидроксилламин N-(1-гидрокси-2,2,6,6-тетраметилпиперидин-4-ил)-2-метилпропанамид гидрохлорида (ТМТН) (Институт органической химии, Новосибирск). Определение спектров ЭПР проходило при мощности СВЧ излучения 1 мВт, амплитуде высокочастотной модуляции 0,3 Гаусс, на частоте 9,72 ГГц, с использованием капилляров объемом 25 мкл в условиях комнатной температуры, при этом 1 мМ ТМТН вносили в 1 мл суспендированных клеток *E. coli* K12 ( $1 \times 10^7$  кл/мл).

**Определение содержания металлов в образцах клеток *E. coli* K12.** Количественную оценку содержания металлов осуществляли согласно существующим стандартам Российской Федерации по методическим указаниям Иванова с соавт. [Методические указания МУК 4.1.148303, Иванов с соавт., 2003]. Для измерения использовали масс-спектрометр модели Elan DRC II (PerkinElmer, США). Перед началом измерений образцы проходили микроволновую подготовку в системе MWS-3 (Berghof, Германия) при 150°C в присутствии бидистиллированной воды и HNO<sub>3</sub>.

**Оценка жизнеспособности и пролиферации макрофагов.** Жизнеспособность макрофагов определяли с использованием набора для определения цитотоксичности (Roche, Германия) на основе измерения высвобождения лактатдегидрогеназы (ЛДГ) из поврежденных клеток. Анализ пролиферативной активности проводили с использованием ХТТ-теста (Life Technologies). Анализ выполняли в соответствии со стандартными протоколами. Долю нежизнеспособных клеток вычисляли как процент высвобождения ЛДГ по следующей формуле: процент высвобождения ЛДГ =  $100 \times (\text{высвобождение ЛДГ} - \text{спонтанное высвобождение}) / (\text{максимальное высвобождение} - \text{спонтанное высвобождение})$ , как описано в [Cabrera-Fuentes *et al.*, 2013]. Максимальное высвобождение ЛДГ определяли путем разрушения клеточного монослоя с использованием 1% Triton X-100. Для ХТТ-анализа жизнеспособность клеток выражалась в процентах от контрольного значения.

**Цитофлуориметрический анализ жизнеспособности клеток аденокарциномы легкого A549.** Клетки пассировали в 6-луночные культуральные планшеты (GBO, Германия), выращивали до 50% конфлюэнтного монослоя и заменяли среду на аналогичную, содержащую исследуемые вещества в указанных концентрациях. Для обработки к использовали биназу и сульфат блеомицина *Streptomyces verlicillus* (Sigma, США). Пробы инкубировали 24 и 72 ч. Далее клетки дважды отмывали с помощью натрий-фосфатного буфера, разводили в среде RPMI 1640 и засеивали в 5 мл цитометрические пробирки. Апоптотические изменения клеток фиксировали с помощью проточного цитофлуориметра FACSCanto II (BD, США) с использованием красителя мероцианина-540, связывающимся с остатками фосфотидилсерина на внешней стороне мембраны апоптотических клеток (Sigma, США). В качестве позитивного контроля использовали классический апоптоген камптотецин в концентрации 50 мМ. При анализе результатов использовали программное обеспечение BD FACSDiva.

**Выделение, гидролиз и капиллярный электрофорез РНК.** Тотальную РНК экстрагировали из клеток аденокарциномы человека A549 с использованием reqGOLD Total RNA Kit. Все эксперименты с РНК проводились в воде, свободной от РНКаз. Качество выделенной РНК подтверждали с использованием Nanodrop 2000 (Thermo Scientific) и капиллярного электрофореза. Начальная концентрация РНК перед гидролизом составляла 500 мкг/мл, РНКазу 1 и биназу добавляли в указанных концентрациях, образцы инкубировали при 37°C, 300 об/мин в течение 60 мин. Продукты реакции хранили при 0°C, когда каталитическая активность РНКаз снижена, либо сразу загружалась на кристалл для капиллярного электрофореза, либо сразу использовали для обработки клеток в экспериментах. Капиллярный электрофорез проводили с использованием Bioanalyzer Agilent 2100 и Agilent RNA 6000 Nano Kit.

**Анализ содержания цитокинов.** По истечении 72 ч инкубации макрофагов в присутствии исследуемых веществ аспирировали среду, центрифугировали в течение 5 мин, 2000 g и определяли содержание цитокинов в надосадочной жидкости. Количество IL-6, IL-10, MCP-1, TNF- $\alpha$  в среде инкубирования макрофагов определяли при помощи BD Cytometric Bead Array Mouse Inflammation Kit (BD, США) согласно инструкции производителя. Для анализа образцов применяли цитометр BD FACSCalibur (BD Bioscience, США). При анализе результатов использовали программное обеспечение FlowJo 7.5.

**Вестерн-блоттинг.** Макрофаги лизировали с помощью RIPA-буфера, дополненного протеиназным коктейлем (Roche, Германия), 0,5 мМ фенилметилсульфонилфторида и 2 мМ ортованадата натрия. Клеточные экстракты обрабатывали ультразвуком и хранили при -80°C. Содержание белка определяли по методу Брэдфорда [Bradford, 1976] с использованием бычьего сывороточного альбумина (БСА) в качестве стандарта. Двадцать мкг каждого образца подвергали электрофорезу в 12%-ном SDS-полиакриламидном геле и затем переносили на поливинилидендифторидные

мембраны. Мембраны блокировали с помощью солевого Трис-буфера, содержащего 5% обезжиренного молока или 5% БСА, 50 мМ Трис HCl, 150 мМ NaCl, 0,1% Tween 20, pH 7,6, в течение 1 часа при комнатной температуре. Иммуноблоттинг выполняли с использованием кроличьих антител против MyD88 (1: 1000), NF-κB (p65, 1: 1000), фосфо-NF-κB (субъединица p65, фосфорилированная по серину 536, 1: 1000), NF-κB2 (p100 / p52, 1: 1000) и β-актина крысы (1: 000). Все антитела были от Cell Signaling, США. Для детекции использовали соответствующие вторичные антитела (1: 5000), конъюгированные с пероксидазой хрена (Sigma, США) и ECL-реагентом (Amersham, Австрия). Все процедуры выполнялись в соответствии со стандартными протоколами производителя. Для количественной оценки белков использовали программное обеспечение ImageLab. Экспрессия всех проанализированных белков была нормирована по отношению к β-актину.

**Статистическая обработка результатов.** Математическую обработку результатов проводили в программе GraphPad Prism, GraphPad Software (La Jolla, CA, USA) с использованием непараметрического критерия Манна-Уитни, непарного одностороннего дисперсионного анализа ANOVA, а затем, при необходимости, тестов Tukey's, Dunnett или Bonferroni, для определения статистической значимости количественных показателей несвязанных групп.  $P \leq 0,05$  принимали за достоверный уровень значимости.

## РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ И ОБСУЖДЕНИЕ

### 1.1 Влияние рибонуклеазы *B. pumilus* биназы на кишечную микрофлору

Для детализации молекулярных механизмов действия биназы и для оценки сохранности микрофлоры желудочно-кишечного тракта в качестве модели использовали *E. coli* K12 – непатогенный «безопасный» штамм, применяемый не только в генной инженерии, но и в качестве компонента пробиотической терапии наряду с другими штаммами *E. coli* [Bereswill et al., 2013; Leatham et al., 2009].

#### 1.1.1 Анализ жизнеспособности клеток *E. coli* K12

Количественная оценка содержания в популяции жизнеспособных клеток *E. coli* K12 продемонстрировала, что токсические для опухолевых клеток концентрации биназы, лежащие в диапазоне от 100 до 300 мкг/мл не имели бактерицидного эффекта. Значимых отличий с вариантом без обработки ферментом обнаружено не было. РНКазы в концентрации 100 мкг/мл и 300 мкг/мл не снижала жизнеспособность клеток: доля клеток в популяции составила 5,9% и 5,4%, соответственно (Рисунок 1). Низкая токсичность РНКазы в отношении *E. coli* позволяет предположить, что присутствие биназы в концентрациях, способных проявлять противоопухолевую активность, не будет иметь значительного влияния на нормальную микробную флору тканей.

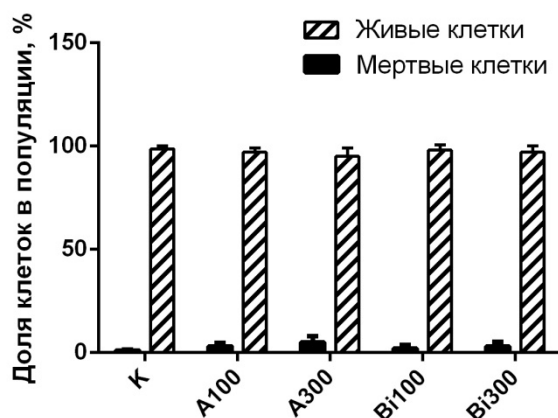


Рисунок 1 – Влияние биназы и РНКазы А на клетки *E. coli* K12. К – контроль; А100 – РНКазы А, 100 мкг/мкл; А300 – РНКазы А, 300 мкг/мл; В100 – биназа, 100 мкг/мл; В300 – биназа, 300 мкг/мл.

### 3.1.2 ЭПР-спектроскопия клеток *E. coli* K12 в присутствии рибонуклеазы *B. pumilus*

В препаратах клеток *E. coli* K12 было обнаружено несколько различных типов ЭПР-сигналов. Первый тип зарегистрирован в замороженных образцах при  $g = 2,00$ , интенсивность данного сигнала в клетках, обработанных биназой, была выше в сравнении с необработанными клетками (Рисунок 2).

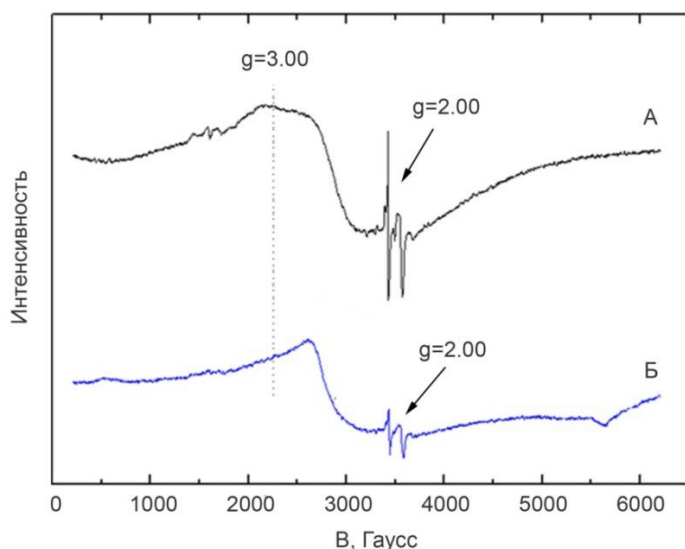


Рисунок 2 – Спектры ЭПР замороженных клеток *E. coli* K12 (СВ частота=9,63 ГГц, мощность СВЧ=20мВт) в широком диапазоне магнитных полей при 77 К. А – клетки бактерий, обработанные биназой (300 мкг/мл, 24 ч), Б – клетки бактерий без обработки.

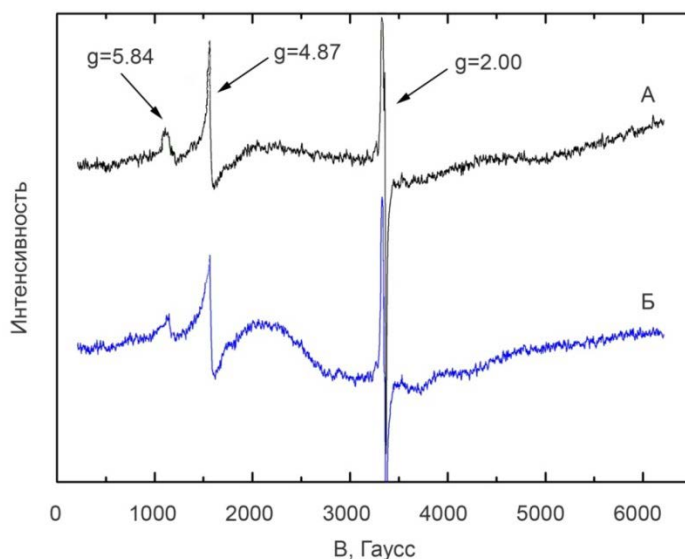


Рисунок 3 – Спектры ЭПР лиофилизированных клеток *E. coli* K12 (СВ частота=9.63 ГГц, мощность СВЧ=20мВт) в широком диапазоне магнитных полей при 15 К, А – клетки бактерий, обработанные биназой (300 мкг/мл, 24 ч), Б – клетки бактерий без обработки.

В препаратах клеток, предварительно подвергнутых лиофильной сушке, был обнаружен сходный сигнал. Воздействие биназы вело к возрастанию его интенсивности (Рисунок 3). Вероятнее всего, источником наблюдаемого сигнала послужил сера-содержащий радикал, что подтверждается характерной формой линии сигнала и значением  $g$ -фактора [Ажипа, 1986]. Следующий обнаруженный в спектрах сигнал имел значение  $g$ -фактора, равное трем. Интенсивность данного сигнала не коррелировала с наличием в среде культивирования РНКаз (Рисунок 2). Третий сигнал, особо заметный при малой развертке магнитного поля, зарегистрирован при  $g=1,93$  (Рисунок 4). Интенсивность сигнала усиливалась в клетках, обработанных РНКазой, но не зависела от интенсивности первого сигнала. Источником третьего сигнала мог послужить железо-содержащий белок [Ажипа, 1986].

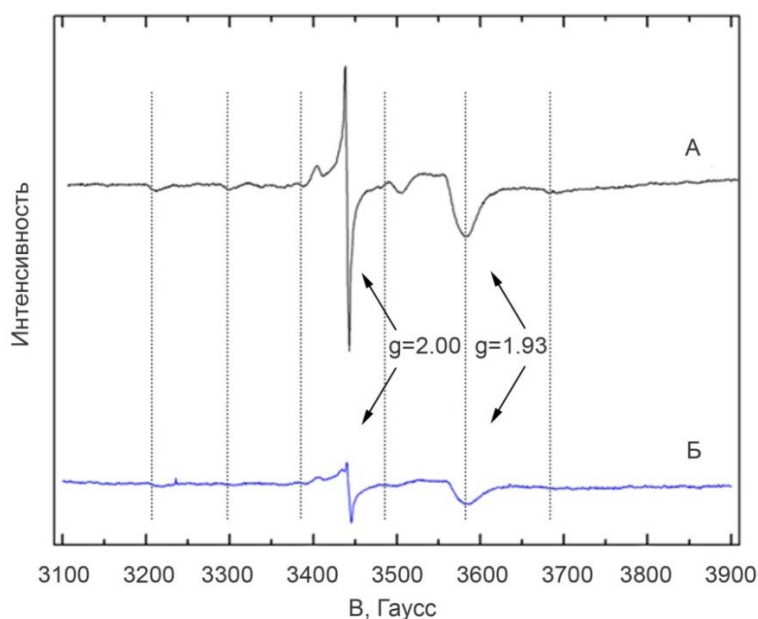


Рисунок 4 – Спектры ЭПР замороженных клеток *E. coli* K12 (СВ частота=9.63 ГГц, мощность СВЧ=20мВт) в области магнитных полей вблизи  $g=2$  при 77 К. А – клетки бактерий, обработанные биназой (300 мкг/мл, 24 ч), Б – клетки бактерий без обработки.

Шесть линий с одинаковой интенсивностью сигнала были зарегистрированы вблизи  $g$ -фактора, равного двум. Они соответствовали ЭПР-спектру сверхтонкой структуры двухвалентного марганца [Коваленко с соавт., 1971]. Затруднение регистрации спектра марганца по мере увеличения развертки поля происходило из-за уширения линий спектра. Сверхтонкая структура марганца хорошо заметна в клетках, подвергнутых воздействию биназы, и фактически не различима в контрольных препаратах (Рисунок 4). В лиофилизированных препаратах клеток *E. coli* K12 было зарегистрировано два ЭПР-сигнала, для которых величина  $g$ -фактора равнялась 5,84 и 4,27, соответственно (Рисунок 3). Согласно литературным данным полученные сигналы происходят от парамагнитных центров белков, содержащих железо [Ажипа, 1986].

Fe-S кластеры представляют собой главные структурные составляющие ЭТЦ бактерий и входят в состав транспортных цепей мембранных клеточных структур эукариот. Данный факт позволяет нам сделать заключение, что наблюдаемые ЭПР-сигналы в области  $g=2$  и  $g=5,84$ , 4,27 и 0,93, принадлежащие серо- и железо-содержащим радикалам, могут происходить от железосерных белков [Ажипа, 1986]. Железосерные белки представляют

собой наиболее распространенную группу переноса электронов, постоянно присутствующую в живых клетках и необходимую для преобразования энергии. Изменения в их составе могут отображать энергетическое состояние биологической системы [Cammack, MacMillan, 2010]. Например, в дрожжах *Saccharomyces cerevisiae*, находящихся в стрессовом состоянии, индуцированном супероксид анионом, уровень свободного железа повышался [Srinivasan *et al.*, 2000]. В клетках прокариот наблюдалась схожая картина: изменение количественного состава [4Fe-4S]-кластеров, выраженное в значительном усилении интенсивности сигнала от железа, явилось следствием воздействия супероксид аниона на клетки *E. coli* [Keyer, Imlay, 1996].

Для доказательства внутриклеточной локализации источников ЭПР сигналов была проведена характеристика используемого в работе буфера и супернатантов сред культивирования. Установлено, что все вышеперечисленные типы сигналов наблюдались исключительно в клетках (Рисунок 5).

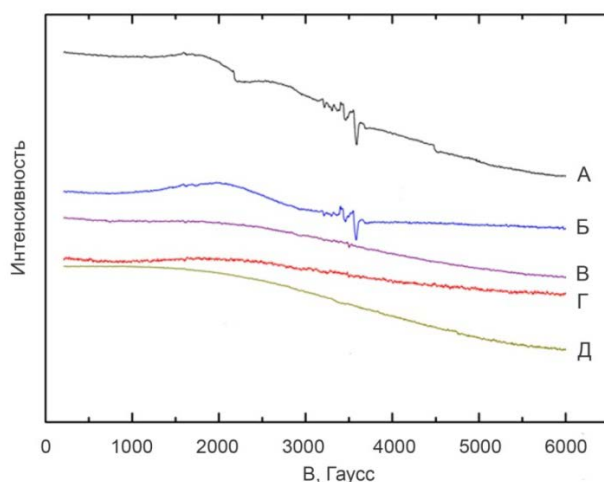


Рисунок 5 – Спектры ЭПР замороженных клеток *E. coli* K12 (СВ частота=9.63 ГГц, мощность СВЧ=20мВт), отрицательного контроля и супернатантов. А – клетки бактерий, обработанные биназой (300 мкг/мл, 24 ч), Б – клетки бактерий без обработки, В – натрий-фосфатный буфер, Г – супернатант после осаждения клеток, инкубированных с биназой, Д – супернатант после осаждения необработанных клеток.

### 3.1.3 Элементный анализ клеток *E. coli* K12

Элементный анализ изменения количества металлов в составе клеток *E. coli* K12, обработанных РНКазой *B. pumilus* в концентрациях 100 и 300 мкг/мл, показал, что биназа ведет к повышению уровня калия, натрия, лития (группа щелочных металлов), кальция, магния (группа щелочноземельных металлов), цинка, меди, железа, марганца, хрома (группа переходных металлов), свинца и висмута (группа постпереходных металлов) (Таблица 1). Самая высокая из используемых в работе концентраций биназы привела к значительному увеличению уровня переходных металлов в микробных клетках. Концентрация цинка, меди и марганца увеличилась в 2,9, 4,8 и 5,9 раз, соответственно.

Несмотря на то, что цинк является важнейшим микроэлементом, участвующим в процессах, протекающих в клетке, его повышенное содержание может повреждать структурные компоненты живых систем, в связи с этим увеличение количества внутриклеточного цинка представляет для клетки некоторую опасность [Blencowe, 2003].

Таблица 1 – Изменение внутриклеточного содержания металлов при обработке культуры *E. coli* K12 биназой (100 мкг/мл и 300 мкг/мл).

Элементы	Содержание металлов, нг/1000 клеток					
	Без обработки РНКазой		Биназа, 100 мкг/мл		Биназа, 300 мкг/мл	
Li	0.003	±0,0002	0.008	±0,0009	0.006	±0,0006
Na	0.13	±0.0005	0.69	±0.001	0.78	±0.02
K	0.36	±0.007	0.61	±0.02	0.63	±0.007
Mg	0.414	±0.001	1.03	±0.07	0.48	±0.05
Ca	13.87	±0.02	19.97	±0.1	21.55	±0.06
Cr	0.015	±0.0006	0.024	±0.001	0.032	±0.002
Mn	0.022	±0.001	0.11	±0.02	0.13	±0.005
Fe	0.98	±0.01	1.10	±0.09	1.19	±0.02
Cu	0.096	±0.0005	0.25	±0.06	0.47	±0.05
Zn	0.039	±0.0014	0.089	±0.007	0.115	±0.07
Bi	0.00024	±0.00005	0.001	±0.0001	0.00099	±0.0001
Pb	0.013	±0.002	0.16	±0.005	0.18	±0.009

Медь, как и другие переходные металлы, является структурным компонентом ферментов, катализирующих перенос одиночных электронов. Белки, содержащие в качестве своего структурного компонента медь, у грамотрицательных прокариот обычно располагаются в области периплазматического пространства либо выделяются во внешнюю среду. Таким образом ограничивается накопление меди в цитозоле. Для защиты от избыточной аккумуляции данного металла в прокариотических клетках возникли специальные системы, предотвращающие интоксикацию [Rensing, McDevitt, 2013]. Зарегистрированное увеличение уровня меди в образцах *E. coli* K12 при обработке биназой (Таблица 1), возможно, является следствием нарушения работы защитных систем и аккумуляцией данного металла внутри клеток.

Гомеостаз марганца – еще одного переходного металла, повышенное содержание которого было обнаружено в клетках *E. coli* K12 – регулируется с помощью ионного транспорта [Jakubovics, Jenkinson, 2001]. Марганец входит в структуру Mn-супероксиддисмутазы, которая участвует в работе систем защиты от АФК. Повышение уровня внутриклеточного свободного марганца служит для ряда бактерий защитой от супероксид аниона, однако принципы работы таких систем нейтрализации окислительного стресса до сих пор исследованы в недостаточной степени [Jakubovics, Jenkinson, 2001, Inaoka *et al.*, 1999].

Таким образом, изменения количественного состава железосерных белков в клетках *E. coli* K12, сопровождаемое значительным увеличением содержания переходных металлов Zn и Cu, способных активировать окислительный стресс, а также повышением уровня внутриклеточного Mn(II), который, напротив, участвует в работе систем защиты от АФК, свидетельствуют о модуляции функционального состояния и структуры ферментных комплексов бактерий и развитию окислительного стресса.



### 3.1.4 Генерация активных форм кислорода клетками *E. coli* K12 под действием биназы

АФК имеют ключевое значение в функционировании клетки. При воздействии биназы на микробные клетки отмечалось значительное усиление (порядка 100%) ЭПР сигнала от ТМТН, тогда как в необработанных клетках подобного не наблюдалось (Рисунок 6). Данный факт свидетельствует об увеличении продукции АФК в клетке, что подтверждает развитие окислительного стресса у *E. coli* K12 под действием биназы. В своих ранних исследованиях мы отмечали вклад биназы в понижение митохондриального мембранного потенциала злокачественных клеток [Ilinskaya *et al.*, 2008]. Общепринятой является гипотеза возникновения эукариотических митохондрий в результате внутреннего симбиоза с аэробными микроорганизмами [Kurland, Andersson, 2000]. Учитывая этот факт, вполне возможно, что влияние биназы на функционирование таких компонентов ЭТЦ мембраны прокариотических организмов, как железосерные белки, будет иметь схожие механизмы, (Рисунки 2 – 5).

Главным источником АФК в клетках эукариотических организмов является ЭТЦ митохондрий [Cadenas, Davies, 2000]. Она состоит из четырех комплексов ферментов, способных в той или иной мере производить супероксид [Zhang, Gutterman, 2007]. Данные о способах образования супероксида в митохондриях эукариот и ферментных комплексах прокариотических организмов показывают, что эти процессы сходны между собой, что подтверждает эволюционную близость данных систем [Lanciano *et al.*, 2013]. Все вышеперечисленное дает основание сделать вывод, что регистрируемый окислительный стресс, вызванный присутствием биназы, является результатом нарушения нормальной работы ЭТЦ. Стоит отметить, что зафиксированное нами увеличение в составе клеток *E. coli* K12 уровня переходных металлов после воздействия биназы в свою очередь усиливает окислительный стресс в результате протекания реакции Фентона, в ходе которой происходит взаимодействие  $H_2O_2$  с переходными металлами [Benov, 2001].

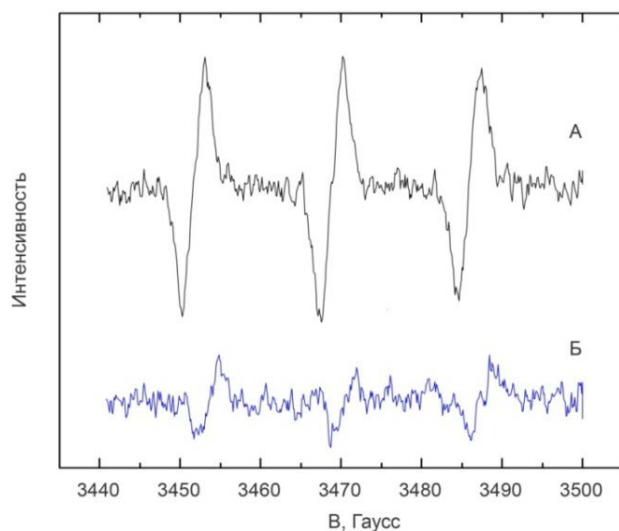


Рисунок 6 – Спектры ЭПР-аддуктов спиновой ловушки ТМТН при обработке клеток *E. coli* K12. А – клетки бактерий, обработанные биназой (300 мкг/мл, 24 ч), Б – клетки бактерий без обработки.



## **3.2 Биологические эффекты биназы в отношении иммунной системы**

Непосредственно после введения терапевтических препаратов начинается развитие иммунного ответа, способного оказывать значительное влияние на окончательный итог терапии. В литературе встречается множество данных о разностороннем воздействии противоопухолевых агентов на иммунную систему. Для ряда агентов, например, гливека, метотрексата и циклофосфида [Seggewiss *et al.*, 2005; Weinblatt, 2013; Weiner, Cohen, 2002], характерно иммуноподавляющее действие. Напротив, доксорубин, гемцитабин и 5-фторурацил проявляют иммуностимулирующую активность [Tanaka *et al.*, 2002; Zagozdzon *et al.*, 1998; Plate *et al.*, 2005]. РНКазы, обладающие противоопухолевой активностью, такие как онконаза и BS-РНКазы, также способны индуцировать иммунные реакции [Rutkoski, Raines, 2008].

### **3.2.1 Цитотоксичность биназы и РНК по отношению к макрофагам**

Влияние биназы и РНКазы А, тотальной внеклеточной РНК выделенной из клеток А549, и продуктов гидролиза РНК (коротких олигонуклеотидов) на рост и жизнеспособность макрофагов исследовали с использованием ХТТ-теста и теста на высвобождение ЛДГ. Установлено, что обработка тотальной РНК, РНКазой А и биназой не влияла на жизнеспособность макрофагов RAW234.7 и THP-1 после 3 и 6 ч инкубирования. Стауроспорин в концентрации 1 мкМ, используемый в качестве позитивного контроля, привел к гибели значительной части (60%) популяции клеток после 6-часовой экспозиции. Сходные результаты были получены при использовании ЛДГ-теста: при воздействии экзогенной РНКазы, биназы и РНК высвобождения ЛДГ из клеток макрофагов не наблюдалось. Таким образом, экзогенные РНКазы А, биназа и тотальная РНК, выделенная из клеток А549, не снижали жизнеспособность макрофагов THP-1 и RAW264.7.

### **3.2.2 Профиль гидролиза РНК, индуцируемый биназой и РНКазой А**

РНКазы обладают спектром, однако, до сих пор неизвестно, опосредуются ли биологические эффекты они самим ферментом, либо продуктами его каталитической активности. В связи с вышесказанным особенно актуальными представляются сравнение способности биназы, её нецитотоксического аналога РНКазы А и продуктов их гидролиза активировать макрофаги мыши и человека. Для получения низкомолекулярных продуктов каталитической активности РНКазы высокомолекулярную РНК, выделенную из клеток А549, подвергали гидролизу биназой и РНКазой А в широком диапазоне концентраций. В отсутствие РНКаз на электрофореграмме наблюдали два бэнды, соответствующие рибосомной 28S и 18S РНК (Рисунок 7). Бэнд, соответствующий 28S РНК, исчезал после 1 часа воздействия РНКазы А в концентрации 2 нг/мл и биназы в концентрации 100 нг/мл (Рисунок 7). Таким образом, РНКазы А обладают более высокой каталитической активностью по

сравнению с биназой в отношении рибосомной РНК. При низких концентрациях ферментов образовывались схожие профили фрагментации РНК (Рисунок 8, Б, Г), тогда как при более высоких концентрациях ферментов профили генерированных низкомолекулярных продуктов фрагментации РНК значительно различались (Рисунок 8, В, Д). Можно предположить, что различия в профиле фрагментации РНК отчасти приводят к различиям в производимых ими биологических эффектах. В частности, нецитотоксические РНКазы поджелудочной железы обладают крайне низкой иммуногенностью [Matousek et al., 2003], не связываются с поверхностью клетки и не интернализуются в клетку [Bracale et al., 2002], тогда как цитотоксическая биназа связывается с мембранными рецепторами RAS и эффективно проникает в клетки [Cabrera-Fuentes et al., 2013, Pinskaya et al., 2016]. Известно, что профиль фрагментов гидролиза РНК-транскрипта гена hSK4 под действием биназы выявляет фрагменты размером 19–31 нуклеотидов, соответствующие малым РНК, вовлеченным в регуляторный механизм РНК-интерференции [Mitkevich et al., 2010], что позволяет считать вклад в противоопухолевую активность определенных продуктов гидролиза РНК биназой весьма вероятным.

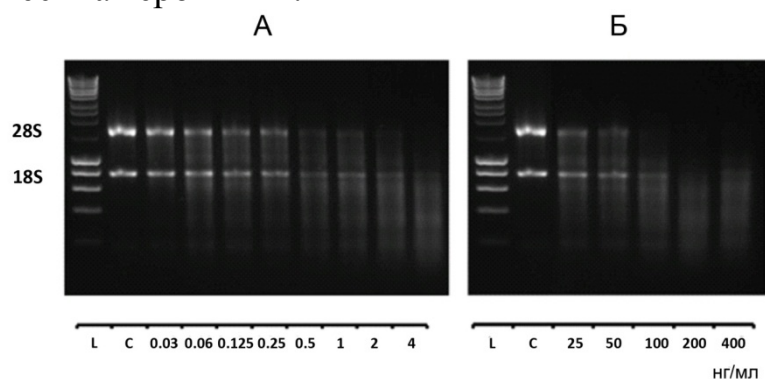


Рисунок 7 – Электрофорез в агарозном геле фрагментов тотальной РНК, выделенной из клеток карциномы легких человека A549, и подвергнутой гидролизу биназой и РНКазой А в указанных концентрациях. Представлены данные трех независимых экспериментов. Начальная концентрация РНК – 500 мкг/ мл. А – РНКазы А. Б – биназа: L - РНК HyperLadder 1kb (Bioline).

### 3.2.3 Изменение спектра цитокинов, синтезируемых макрофагами под действием биназы

Макрофаги играют решающую роль в регуляции про- и противовоспалительного ответа иммунной системы, запуская высокоэффективную иммунную реакцию против патогенов. В нормальных условиях макрофаги обычно демонстрируют противовоспалительный фенотип, участвуя в восстановлении тканей [Hamilton, 2008; Lawrence, Natoli, 2011]. При возникновении опухоли макрофаги особенно многочисленны и присутствуют на всех стадиях прогрессирования заболевания [Noy, Pollard, 2014; Wynn et al., 2013]. Макрофаги, ассоциированные с опухолями, играют двоякую роль, либо способствуя росту и метастазированию опухоли, подавлению иммунитета и ангиогенезу, либо активируя противовоспалительные процессы и подавляя рост опухоли [Rivera, Bergers, 2013]. M1 макрофаги

синтезируют высокий уровень провоспалительных цитокинов, включая TNF- $\alpha$ , IL-1, IL-23p19, IL-6, тогда как макрофаги M2 демонстрируют высокий уровень экспрессии IL-10 [Sica, Bronte, 2007; Balkwill, 2004; Cabrera-Fuentes *et al.*, 2015].

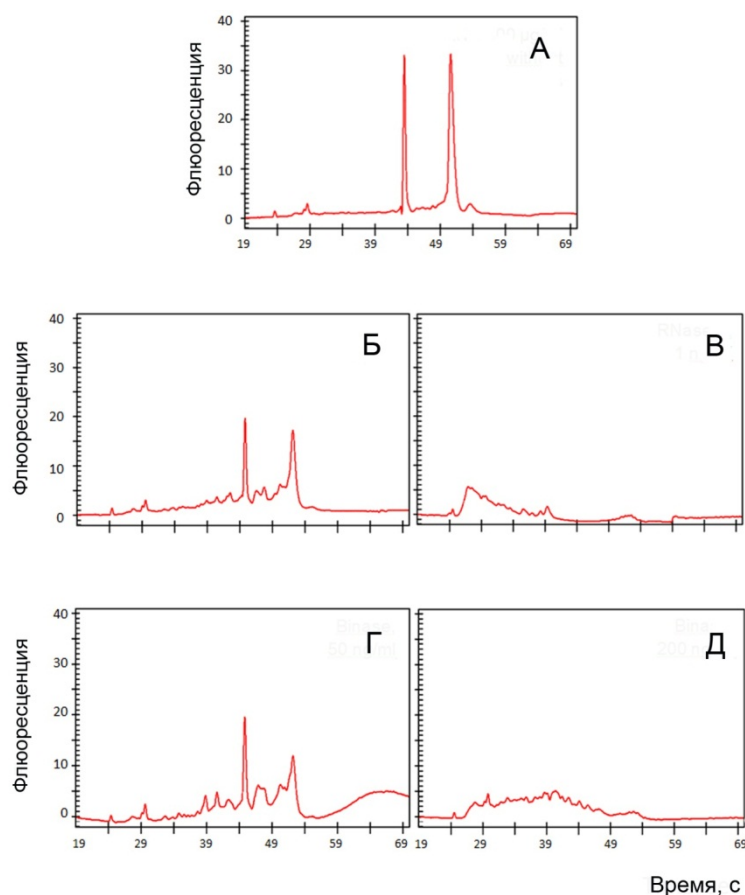


Рисунок 8 – Капиллярный электрофорез фрагментов тотальной РНК, выделенной из клеток карциномы легких человека A549, и подвергнутой гидролизу биназой и РНКазой А. Начальная концентрация РНК – 500 мкг/мл. Представлены данные трех независимых экспериментов. А – РНК 500 мкг/мл в отсутствие РНКаз; Б – РНКазы А, 0,25 нг/мл; В – РНКазы А, 1 нг/мл; Г – биназа, 50 нг/мл; Д – биназа, 100 нг/мл.

Количественный анализ синтеза провоспалительных цитокинов перитонеальными макрофагами мыши показал, что биназа в концентрации 300 мкл/мл индуцирует статистически значимое повышение уровня цитокинов IL-6, MCP-1 и TNF- $\alpha$ : их содержание в среде культивирования увеличилось в 2,2, 5,2 и 4,6 раз, соответственно. Инкубирование макрофагов в отсутствие РНКаз либо в присутствии нецитотоксической РНКазы А не повлияло на количественное содержание цитокинов в среде. Биназа в концентрации 100 мк/мл также приводила к усилению продукции цитокинов, повышая уровень IL-6 в 1,4, MCP-1 – в 2,3 и TNF- $\alpha$  – в 2,5 раза (Рисунок 9, А-В).

MCP-1 входит в число основных цитокинов, участвующих в регулировании процесса миграции и инфильтрации моноцитов/макрофагов [Deshmane *et al.*, 2009]. Поскольку данный цитокин также вовлечен в развитие провоспалительных процессов, усиление его синтеза под действием биназы указывает на предположительное развитие воспаления в сайте возникновения опухоли, что, в свою очередь, может быть ассоциировано с усилением противоопухолевого потенциала фермента.

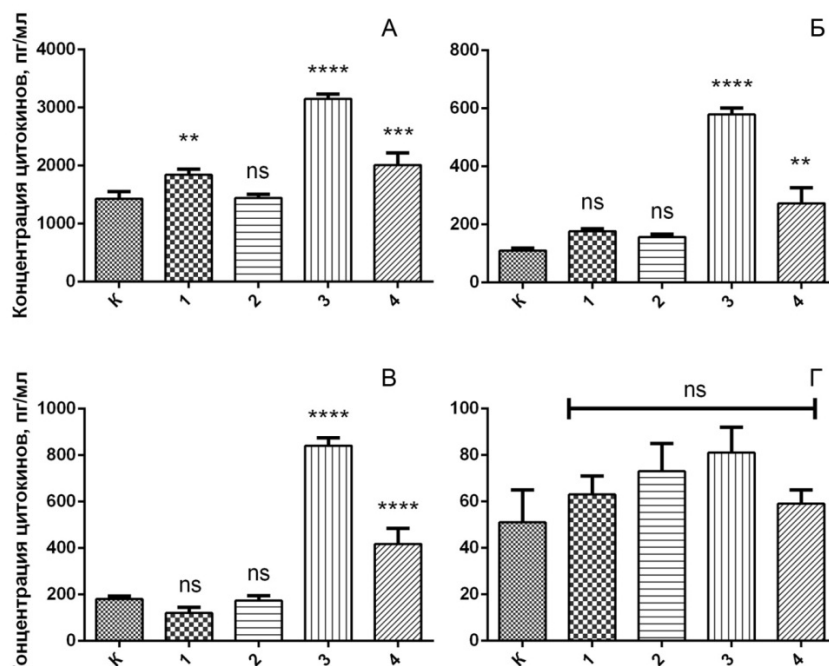


Рисунок 9 – Количественная оценка синтеза цитокинов периферическими макрофагами мыши. А – IL-6; Б – MCP-1; В – TNF- $\alpha$ ; Г – IL-10: К – контроль (нестимулированные клетки); 1 – РНКазы А, 300 мкг/мл; 2 – РНКазы А, 100 мкг/мл; 3 – биназа, 300 мкг/мл; 4 – биназа, 100 мкг/мл. \*\* $P < 0,01$ ; \*\*\* $P < 0,001$ ; \*\*\*\* $P < 0,0001$  vs контроль; ns=non-significant.

Усилению продукции макрофагами цитокина MCP-1 сопутствует повышенный уровень IL-6 в среде культивирования макрофагов. Эти результаты хорошо согласуются с данными литературы, поскольку IL-6 выступает в роли индуктора MCP-1 [Biswas *et al.*, 1998]. Стоит отметить, что локальное IL-6-сигнализирование играет важную роль в ингибировании и контроле роста злокачественных клеток, в том числе рака молочной железы [Dethlefsen *et al.*, 2013]. О возможном усилении естественной противоопухолевой активности макрофагов также свидетельствует активация биназой синтеза TNF- $\alpha$  [Van Horssen *et al.*, 2006].

Статистически значимого увеличения уровня продукции противовоспалительного цитокина IL-10 не было обнаружено ни в одном из вариантов обработки макрофагов РНКазой (Рисунок 9, Г). Это свидетельствует о том, что применение биназы в качестве потенциального противоопухолевого терапевтика не приведет к подавлению рекрутинга NK-клеток, обладающих ингибирующей рост раковых клеток активностью [Scott *et al.*, 2006].

### 3.2.4 Активация канонического NF- $\kappa$ B-сигнального пути в макрофагах

Известно, что клетки острого миелоидного лейкоза Kasumi-1, экспрессирующие онкоген KIT, проявляют наибольшую чувствительность к токсическим действиям биназы [Mitkevich *et al.*, 2011]. В клетках Kasumi-1 биназа активировала ряд регуляторных механизмов, в том числе сигнальный путь NF- $\kappa$ B [Mitkevich *et al.*, 2013]. Изменение уровня транскрипции NF- $\kappa$ B характерно и для клеток Т-лимфобластной лейкемии линии Jurkat [Burnysheva *et al.*, 2017]. NF- $\kappa$ B является универсальным фактором транскрипции, контролирующим экспрессию генов иммунного ответа, апоптоза и клеточного цикла [Oeckinghaus *et al.*, 2009]. Дифференциации макрофагов также требует активация NF- $\kappa$ B сигнального пути, регулирование

воспалительных реакций в основном зависит от этого транскрипционного фактора [Biswas, Lewis, 2010]. Основываясь на этих данных можно предположить, что РНКазы и/или продукты их гидролиза будут проявлять биологическую активность по отношению к макрофагам при участии NF-κB сигнального пути. Белки семейства NF-κB проявляют активность в димерной форме, их транскрипционная активность стимулируется фосфорилированием одной из субъединиц [Hoffmann, Baltimore, 2006].

Макрофаги стимулировали интактной или фрагментированной РНК, РНКазой А или биназой. При стимуляции экзогенными РНКазми уровень экспрессии фосфорилированной по серину-536 р65-субъединицы NF-κB (фосфо-р65) повысился в 1,7 раз в макрофагах мыши линии RAW264.7 (Рисунок 10, А) и в 2,3 раза в макрофагах человека линии ТНР-1 (Рисунок 10, Б) после 0,5 ч стимуляции и оставался стабильно высокими в течение 3 часов стимуляции (Рисунок 11, А, Б). Значимых изменений уровня экспрессии нефосфорилированной формы NF-κB также не обнаружено.

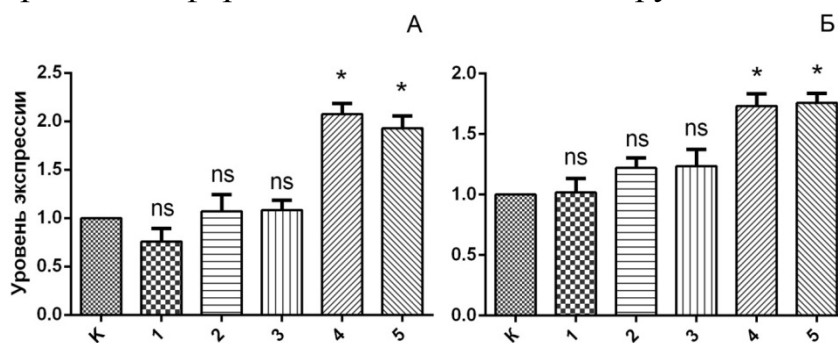


Рисунок 10 – Количественная оценка уровня экспрессии фосфо-р65 NF-κB в макрофагах мыши RAW264.7 и человека ТНР-1 после 30 мин стимуляции. Представлены данные трех независимых экспериментов. А – ТНР-1 макрофаги; Б – RAW264.7 макрофаги: К - контроль (нестимулированные клетки); 1 – РНК, 2 – фрагменты РНК, полученные гидролизом РНК РНКазой А; 3 – фрагменты РНК, полученные после гидролиза РНК биназой; 4 – РНКазы А; 5 – биназа. \*P<0,05 vs контроль; ns=non-significant.

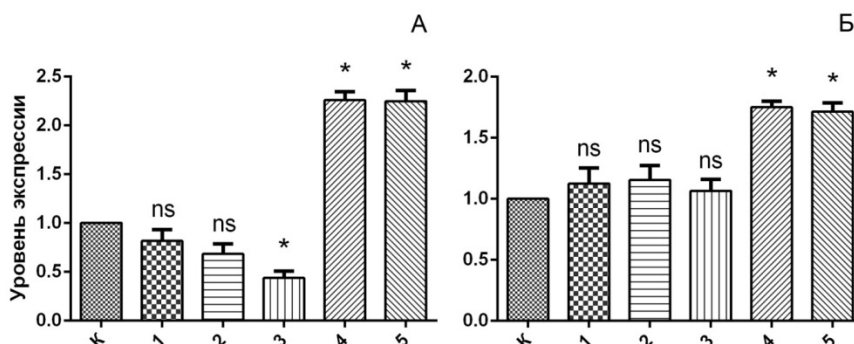


Рисунок 11 – Количественная оценка уровня экспрессии фосфо-р65 NF-κB в макрофагах мыши RAW264.7 и человека ТНР-1 после 3 ч стимуляции. Представлены данные трех независимых экспериментов. А – ТНР-1 макрофаги; Б – RAW264.7 макрофаги: К - контроль (нестимулированные клетки); 1 – РНК, 2 – фрагменты РНК, полученные гидролизом РНК РНКазой А; 3 – фрагменты РНК, полученные после гидролиза РНК биназой; 4 – РНКазы А; 5 – биназа. \*P<0,05 vs контроль; ns=non-significant.

NF-κB сигнальный путь является отличительной чертой воспалительных реакций, характерных для опухолей [Mayo, Baldwin, 2000], однако его активация необходима и для поддержания противоопухолевого иммунитета [Zeligs et al., 2016]. Так, в ряде исследований обнаружено, что при развитии рака груди активация NF-κB в макрофагах ведет к снижению числа метастазов в легких [Connelly et al., 2011]. Активация NF-κB в миелоидных клетках играет существенную роль при цитокин-зависимой поляризации иммунных системы [Richmond, Yang, 2016], а снижение уровня экспрессии белков данного семейства в опухоль-ассоциированных макрофагах при развитии мультиформной глиобластомы коррелировало с нарушениями иммунного ответа [Mieczkowski et al., 2015], что свидетельствует о пластичности функций NF-κB.

Одним из путей активации NF-κB является передача сигнала от т.н. Toll-подобных рецепторов (Toll-like receptors, TLR). Сигнализирование от всех типов данных рецепторов, за исключением TLR-3, идет с помощью универсального адаптера – фактора первичного ответа миелоидной дифференциации 88, или MyD88. [Janssens et al., 2002.] При стимуляции внеклеточной РНК или фрагментами РНК не было обнаружено изменений экспрессии MyD88, что может свидетельствовать об активации NF-κB по TLR не зависимым путем. Эти данные хорошо согласуются с результатами, согласно которым внеклеточная РНК индуцирует синтез провоспалительных цитокинов в макрофагах не зависимо от активации TLR -2 и -4 [Simsekylmaz et al., 2014].

### **3.2.5. Влияние биназы на компоненты неканонического NF-κB пути**

Помимо общеизвестного канонического пути, существуют механизмы, инициирующие активацию альтернативного неканонического NF-κB пути, активной субъединицей которого является p52 и ее предшественник – субъединица p100. С помощью индуцируемой обработки p100-p52 неканонический путь NF-κB активирует комплекс RelB / p52 NF-κB [Sun, Ley, 2008]. Стимуляция макрофагов биназой привела к экспрессии субъединицы p100 на крайне низком уровне, однако после часа инкубации эффект сошел на нет. Экспрессия активной формы p52 не наблюдалась. Отсутствие активации неканонического сигнального пути на фоне активации канонического можно рассматривать как положительный биологический эффект биназы, поскольку одновременное присутствие обеих форм NF-κB играет значительную роль в развитии вирус-индуцированного Т-клеточного лейкоза [Sun, 2014].

## **3.3 Терапевтический потенциал биназы как компонента сочетанной терапии**

Терапевтический потенциал биназы был оценен в сочетании с противоопухолевым антибиотиком блеомицином, который способен вызывать повреждение ДНК и фрагментацию РНК [Burger, 1998]. Блеомицин достаточно широко известен как средство терапии злокачественных новообразований, в частности плоскоклеточного рака пищевода, легкого,

слизистой ротовой полости, гортани и носоглотки [Avendano, Menendez, 2008]. Оценка цитотоксичности комплекса биназы и блеомицина проведена нами в сочетаниях определенной концентрации одного компонента с возрастающей концентрацией другого. При одновременном воздействии 0,1 мкМ блеомицина/4,15 мкМ биназы доля клеток в состоянии апоптоза составила 21%. Если использовали более высокую концентрацию биназы (0,1 мкМ блеомицина/25 мкМ биназы), то доля апоптотических клеток достигала 31%. Однако даже в этом случае уровень апоптоза был ниже, чем индуцированный только биназой (40%) (Рисунок 12, А, Б). Таким образом, сочетание низкой малотоксичной концентрации блеомицина с биназой неэффективно. Сочетание низкой концентрации биназы (4,15 мкМ) с возрастающими концентрациями блеомицина (0, 0,1 и 7 мкМ) привело к переходу в апоптоз 11%, 22% и 27% клеток, соответственно. Апоптоз-индуцирующая активность биназы в присутствии возрастающих концентраций блеомицина усилилась, превысив, хотя и незначительно, как собственный уровень апоптогенной активности в данной концентрации, так и блеомицина в максимальной концентрации (24%). Отметим, что совместное воздействие максимальных концентраций исследуемых веществ было неэффективно, в то время как сочетание неапоптогенных концентраций привело к повышению доли апоптотических клеток до 22% по сравнению с индивидуальным действием блеомицина (15%) и биназы (11%) (Рисунок 12). Полученные данные свидетельствуют, что биназа и блеомицин эффективны при сочетании в низких концентрациях.

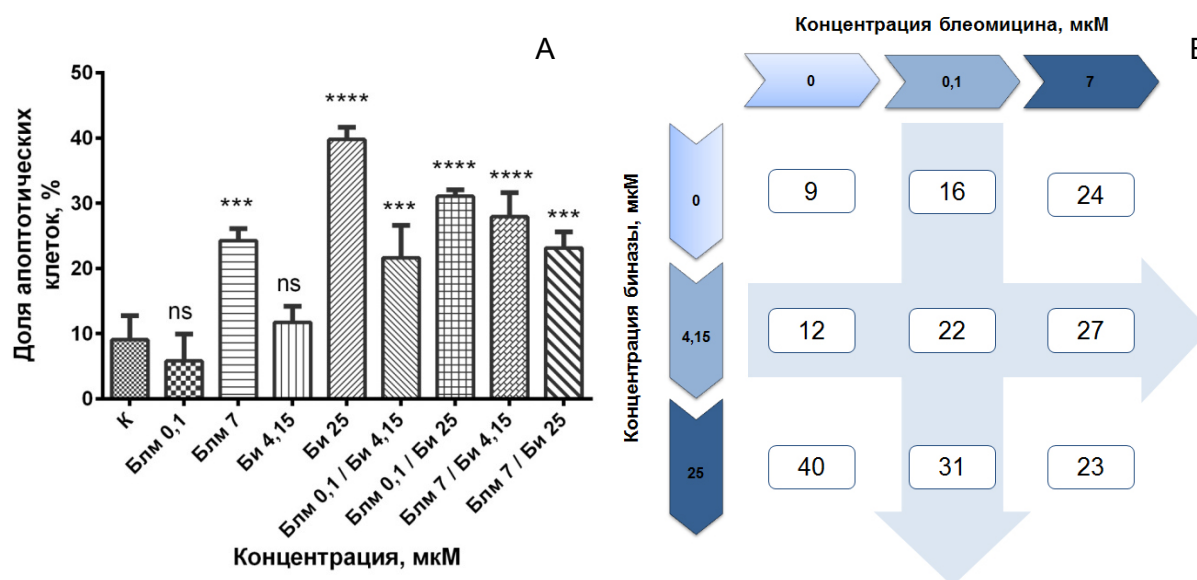


Рисунок 12 – Сочетанное апоптоз индуцирующее действие биназы и противоопухолевого антибиотика блеомицина на клетки аденокарциномы легкого человека А549. А – доля апоптотических клеток в популяции; Б – схема сочетанного действия биназы и блеомицина (в точках пересечения значений концентрации изучаемых веществ приведена доля апоптотических клеток, %): К - контроль; Блм – блеомицин, мкМ; Би – биназа, мкМ. \*\* $P < 0,01$ ; \*\*\* $P < 0,001$ ; \*\*\*\* $P < 0,0001$  vs контроль; ns=non-significant.



Исследуемые соединения имеют схожие механизмы молекулярного действия. Пневмоциты MLE-12 и первичные альвеолярные клетки типа II, подверженные действию блеомицина, переходят в стадию апоптоза по митохондриальному пути, связанному с активацией стрессовой киназы JNK и про-апоптотических белков Bak и Bax [Lee *et al.*, 2005]. С другой стороны, ряд данным свидетельствует об активации блеомицином каспазы 8 и протекании апоптоза первичных клеток эпителия бронхов и эндотелиальных клеток легочной артерии по внешнему пути [Mungunsukh *et al.*, 2010]. Механизм вызванной биназой апоптотической гибели клеток также сочетает как внешний, так и внутренний путь [Mitkevich *et al.*, 2013].

Для онконазы – известной РНКазы с противоопухолевой активностью – выявлено подавление экспрессии 34% генов в клетках линии злокачественной мезотелиомы [Altomare *et al.*, 2010]. Однако онконаза в качестве компонента монотерапии мезотелиомы легких не имела ожидаемой эффективности, в связи с чем были инициированы ее клинические испытания в комплексе с антибиотиком доксорубицином [Porta *et al.*, 2008]. Комбинация онконазы и доксорубицина обладала повышенной цитотоксичностью в отношении клеток диффузной крупноклеточной лимфомы *in vitro*, чем каждый из препаратов в отдельности: цитотоксический индекс онконазы, доксорубицина и комбинации соединений составил 25%, 15% и 35%, соответственно [Majchrza *et al.*, 2013]. Согласно проведенному нами анализу апоптотических клеток аденокарциномы легких, аналогичные цифры для биназы, блеомицина и их комбинации равны 11%, 15% и 22%, что дает основание считать перспективным дальнейшее исследование их комбинированного действия.

Помимо деградации ДНК блеомицин ведет к фрагментации молекулы тРНК. Стоит отметить, что вторая реакция носит более специфичный характер [Abraham *et al.*, 2003]. На уровне РНК механизм воздействия блеомицина в некоторой мере сходен с таковым цитотоксической онконазы. Противоопухолевые свойства онконаза обусловлены, в первую очередь, ингибированием синтеза белка за счет ферментативного разрушения одной или более тРНК. Предположительно оба противоопухолевых препарата специфически расщепляют тРНКAla и тРНКLys [Suhasini, Sirdeshmukh, 2006; Tao *et al.*, 2006]. Каталитическая активность биназы также является важным фактором проявления противоопухолевых свойств фермента [Makarov, Ilinskaya, 2003; Mitkevich *et al.*, 2014]. Вполне возможно, что комбинация биназы с блеомицином в высоких концентрациях приводит к конкуренции этих рибонуклеолитических агентов за связывание с доступной клеточной РНК и дальнейшему снижению апоптогенной активности, чего не происходит при их комбинации в низких концентрациях.



## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В настоящей работе проведено исследование влияния цитотоксической по отношению к малигнизированным клеткам микробной рибонуклеазы биназы на иммунные клетки – макрофаги и представителя кишечной нормофлоры человека – бактерию *E. coli*. Установлено, что экзогенная биназа активирует в макрофагах канонический NF-κB сигнальный путь без участия Toll-подобных рецепторов, приводя к индукции спектра цитокинов, характерным для фенотипа макрофагов M1, инициирующим торможение роста опухолей. Кроме того, биназа вызывает модуляцию функционального состояния и структуры ферментных комплексов кишечных бактерий при окислительном стрессе, что может вносить опосредованный вклад в развитие иммунного ответа опухоленосителей. Использование неапоптогенных концентраций биназы позволяет снизить концентрацию классического противоопухолевого антибиотика блеомицина в составе сочетанной терапии. По результатам экспериментальной работы сделаны следующие основные выводы.

1. Биназа в концентрациях, не оказывающих бактерицидных эффектов на клетки комменсального штамма кишечной микрофлоры человека *E. coli* K12, вызывает изменения сигналов ЭПР с величиной g-фактора 1,93, 4,27 и 5,84. Данные сигналы соответствуют сигналам от железо- и серосодержащих белков, входящих в состав клеточных электрон-транспортных систем.

2. Изменения количественного состава парамагнитных центров *E. coli* K12 сопровождалось значительным увеличением содержания в микробных клетках переходных металлов Zn и Cu, способных активировать окислительный стресс, а также повышением уровня внутриклеточного Mn(II), который, напротив, участвует в работе систем защиты против окислительного стресса, что свидетельствует о модуляции функционального состояния и структуры ферментных комплексов бактерий при окислительном стрессе.

3. Присутствие биназы в среде культивирования макрофагов вдвое повышает уровень экспрессии белков фосфо-NF-κB p65, что подтверждает активацию экзогенными РНКазы канонического NF-κB сигнального пути. Отсутствие изменений уровня экспрессии белка-адаптера Toll-подобных рецепторов MyD88, передача сигналов от которого является одним из путей активации NF-κB сигнального пути, говорит о том, что активация идет по независимым от Toll-подобных рецепторов путям.

4. Биназа приводит к повышению в среде культивирования макрофагов уровня провоспалительных цитокинов IL-6, MCP-1 и TNF-α, но не противовоспалительного цитокина IL-10. Данный профиль цитокинов соответствует макрофагам с фенотипом M1, инициирующим процессы подавления роста опухоли.

5. Профили генерированных низкомолекулярных продуктов гидролиза рибосомной РНК, выделенной из опухолевых клеток карциномы

легких человека A549, были схожими при низких концентрациях биназы и РНКазы А, но значительно различались при более высоких концентрациях ферментов, что отчасти обуславливает различия в биологических эффектах этих ферментов, связанных с действием регуляторных низкомолекулярных РНК.

6. Анализ сочетанного действия различных концентраций биназы и противоопухолевого антибиотика блеомицина на клетки аденокарциномы легких человека показал, что совместное воздействие максимальных использованных в работе концентраций исследуемых веществ было неэффективно, в то время как сочетание неапоптогенных концентраций привело к повышению доли апоптотических клеток до 22% по сравнению с индивидуальным действием блеомицина и биназы.

## СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1. Makeeva, A. Antitumor Macrophages Response to *Bacillus pumilus* Ribonuclease (BINASE) / A. Makeeva, J. Rodriguez-Montesinos, P. Zelenikhin, A. Nesmelov, Preissner K.T., Hector A. Cabrera-Fuentes Ilinskaya O.N. // Mediators of Inflammation. – 2017. – V. 2017. – 11 p. (Scopus).

2. Zelenikhin, P.V. The combined action of binase and bleomycin on human lung adenocarcinoma cells / P.V. Zelenikhin, A.V. Makeeva, T.N. Nguen, Y.A. Siraj, O.N. Ilinskaya // Biochemistry (Moscow) Supplement Series B: Biomedical Chemistry. – 2016. – V. 10. – N.1. – P.87 – 90. (BAK, Scopus).

3. Ложкин, А.П. Биназа индуцирует провоспалительный иммунный ответ макрофагов / А.П. Ложкин, П.В. Зеленихин, А.В. Макеева, Е.А. Соколова, О.Н. Ильинская // Гены и клетки. – 2014. – Т.9. – N.3. – С. 1 – 3. (Scopus).

4. Zelenikhin, P.V. Effect of *Bacillus pumilus* ribonuclease on the paramagnetic centers of microbial cells / P.V. Zelenikhin, A.V. Makeeva, A.P. Lozhkin, A.A. Rodionov, N. Nguen, O.N. Ilinskaya // Microbiology. – 2013. – V. 82. – N.6. – P. 772-777. (BAK, Scopus, Web of science).

5. Makeeva, A. *Bacillus pumilus* ribonuclease binase induces proinflammatory immune response in macrophages / A. Makeeva, Y. Surchenko, H.A. Cabrera-Fuentes, J. Rodriguez-Montesinos, P. Zelenikhin, K.T. Preissner, O.N. Ilinskaya // European Journal of Clinical Investigation. – 2018. – V. 48. – Special Issue: Supplement: 1. – P. 106.

6. Макеева А.В. Комплексное действие биназы и блеомицина на клетки аденокарциномы легких человека / А.В. Макеева, П.В. Зеленихин, Е.А. Сирадж, О.Н. Ильинская // Сборник тезисов I Международной школы-конференции студентов, аспирантов и молодых ученых «Биомедицина, материалы и технологии XXI века». Казань, 2015. – С. 125.

7. Макеева, А.В. Биназа не снижает жизнеспособность макрофагов / А.В. Макеева, А.А. Несмелов, Э.А. Кабрера Фуентес, О.Н. Ильинская. // 19-

ая Международная Пущинская школа-конференция молодых ученых – Биология Наука XXI века. – Пущино, 2015. – С. 186.

8. Макеева, А.В. Влияние бактериальной РНКазы биназы и блеомицина на клетки рака легких человека A549 / А.В. Макеева, Е.А. Сирай, П.В. Зеленихин // Микробиология в современной медицине: Материалы всероссийской заочной научно-практической конференции с международным участием. – Казань, 2014. – С. 31-32.

9. Макеева, А.В. Детекция молекулярных маркеров патологических процессов в клетках прокариот методом ЭПР / А.В. Макеева, А.П. Ложкин, А.А. Родионов, П.В. Зеленихин // Микробиология в современной медицине: Материалы всероссийской заочной научно-практической конференции с международным участием. – Казань, 2013. – С. 32-34.

Е-mail автора: AVMakeeva.kpfu@gmail.com

Адрес для отзывов на автореферат:

420008, Казань, ул. Кремлевская, 18, главное здание Казанского (Приволжского) федерального университета, отдел аттестации научно-педагогических кадров, Ученому секретарю Диссертационного совета Д 212.081.36 Абрамовой Зинаиде Ивановне, факс: (843) 238-76-01. Е-mail: ziabramova@mail.ru.