

УДК 577.151.6; 577.152.314; 577.18.03; 615.015.21

©Коллектив авторов

СОЧЕТАННОЕ ДЕЙСТВИЕ БИНАЗЫ И БЛЕОМИЦИНА НА КЛЕТКИ АДЕНОКАРЦИНОМЫ ЛЁГКИХ ЧЕЛОВЕКА

П.В. Зеленихин^{1*}, А.В. Макеева¹, Т.Н. Нгуен¹, Е.А. Сирадждж^{1,2}, О.Н. Ильинская¹

¹Институт фундаментальной медицины и биологии, Казанский (Приволжский) федеральный университет, 420008, Казань, ул. Кремлёвская, 18; тел.: (843)2337884; эл. почта: pasha_mic@mail.ru

²Медицинский колледж университета Бахр-Дар, Эфиопия, г. Бахр-Дар, 79

Ряд рибонуклеаз микроорганизмов оказывает селективное цитотоксическое действие в отношении широкого спектра опухолевых клеток. Особенно перспективным представляется использование цитотоксичных РНКаз в составе комплексной терапии совместно с другими химиотерапевтическими средствами. В настоящей работе исследовано индуцирующее апоптоз действие РНКазы *Bacillus pumilus* (биназы) в сочетании с известным противоопухолевым антибиотиком блеомицином на клетки аденокарциномы легкого человека А549. При использовании высоких концентраций исследуемых веществ взаимное усиление индуцирующего апоптоз действия препаратов не обнаружено; сочетание неапоптогенных концентраций привело к повышению доли апоптотических клеток до 22% по сравнению с индивидуальным действием блеомицина (6%) и биназы (12%). Полученные данные свидетельствуют, что биназа и блеомицин эффективны при сочетании в низких и неэффективны при сочетаниях в высоких концентрациях.

Ключевые слова: цитотоксичные рибонуклеазы, *Bacillus pumilus*, биназа, блеомицин, противоопухолевая активность, аденокарцинома лёгких

DOI 10.18097/PBMC20166203279

ВВЕДЕНИЕ

Среди рибонуклеаз (РНКаз) различного происхождения обнаружен ряд ферментов с противоопухолевой активностью. Избирательная цитотоксичность РНКаз по отношению к клеткам, экспрессирующим определенные онкогены, может быть использована для разработки препаратов РНКаз в качестве средств целенаправленной терапии. РНКазы *Bacillus pumilus* (прежнее название штамма *B. intermedius* [1]) проявляет избирательную цитотоксичность к клеткам, экспрессирующим онкогены *ras* [2], *kit* [3], *AML1-ETO* [4], *TNF* [5]. Для наиболее известной РНКазы с противоопухолевой активностью – онконазы (РНКазы леопардовой лягушки *Rana pipiens*) – выявлено ингибирующее действие на экспрессию 34% генов клеток злокачественной мезотелиомы лёгких; трёхкратное угнетение экспрессии генов, влияющих на апоптоз (*IL-24*, *TNFAIP3*), транскрипцию (*ATF3*, *DDIT3*, *MAFF*, *HDAC9*, *SNAPC1*) и иммунный ответ (*IL-6*, *COX-2*) [6]. Монотерапия онконазой злокачественной мезотелиомы лёгких не принесла ожидаемых результатов, в связи с чем были начаты её клинические испытания в комплексе с антибиотиком доксорубицином, которые на данный момент проходят III фазу [7]. Проведённый скрининг среди известных противоопухолевых агентов показал, что цитотоксичность онконазы усиливается при совместном введении с тамоксифеном, цисплатином и винкристином; однако наибольшую эффективность фермент проявил в комбинации с доксорубицином [7, 8]. Взаимодействие РНКаз бактериального происхождения с известными средствами противоопухолевой терапии не изучалось.

Учитывая высокую апоптогенную активность биназы по отношению к клеткам карциномы лёгких человека [9], отчасти обусловленную экспрессией клетками мутантного *k-RAS*, мы поставили цель исследовать цитотоксический потенциал этой РНКазы в сочетании с блеомицином, гликопептидным антибиотиком, синтезируемым бактериями *Streptomyces verticillus* и обладающим как ДНК-повреждающим, так и РНК-фрагментирующим эффектами [10].

МЕТОДИКА

Фермент

В работе использована биназа (КФ 3.1.27.3) – гуанилспецифичная РНКазы *B. pumilus* 3-19 дикого типа (молекулярная масса 12,3 кДа, 109 аминокислотных остатков, pI=9,5), выделенная в виде гомогенного белка из культуральной жидкости рекомбинантного штамма *Escherichia coli* BL21, несущего плазмиду pGEMGX1/ent/Bi [11]. Каталитическая активность биназы по отношению к синтетическим субстратам и высокополимерной дрожжевой РНК охарактеризована ранее [12, 13].

Блеомицин

В работе использовали сульфат блеомицина *Streptomyces verticillus* (“Sigma”, США).

Культура клеток

Клеточная линия аденокарциномы человека А549 была получена из Американской коллекции клеточных культур (Роквилл, США). Клетки культивировали

* - адресат для переписки

на питательной среде RPMI 1640 ("Sigma"), содержащей 10% эмбриональную сыворотку телят, 2 мМ глутамин и 100 ед./мл пенициллина и стрептомицина, при 37°C во влажной атмосфере с 5% CO₂.

Клетки пассировали в 6-луночные культуральные планшеты ("GBO", Германия), выращивали до образования 50% конфлюэнтного монослоя и заменяли среду на аналогичную, содержащую биназу, блеомицин, их комбинации и/или FeSO₄ в качестве источника Fe(II). Пробы инкубировали 24 ч и 72 ч.

Проточная цитометрия

Апоптотические изменения клеток фиксировали с помощью проточного цитофлуориметра BD FACSCanto II ("BD", США) с использованием красителя мероцианина-540 ("Sigma") [14].

Статистическую обработку результатов, полученных из трёхкратных повторений каждого эксперимента, проводили стандартными методами в программе Microsoft Excel 2010.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Блеомицин широко используется в химиотерапии раковых заболеваний, главным образом при плоскоклеточном раке слизистых оболочек полости рта, носоглотки, гортани, пищевода и лёгкого [15]. В наших экспериментах с использованием клеток карциномы лёгких человека линии A549 установлено, что блеомицин обладает дозозависимым индуцирующим апоптоз действием в концентрациях от 0,7 мкМ до 7 мкМ. После 24 ч инкубирования с блеомицином (7 мкМ) доля апоптотических клеток в популяции A549 возросла до 30% (рис. 1А), после 72 ч – до 85% (рис. 1Б). Повышение содержания блеомицина в среде на порядок (до 70 мкМ) не привело к увеличению доли апоптотических клеток в популяции (рис. 1Б).

Согласно данным Carter и соавт. [16], кофактором блеомицина служит двухвалентное железо, однако, добавление в среду эквивалентных блеомицину количеств Fe(II) не привело к увеличению апоптогенной активности антибиотика (данные не представлены). По-видимому, даже следовых количеств Fe(II), имеющихся в исходной среде, достаточно для поддержания индуцирующих апоптоз свойств блеомицина.

Как и ожидалось, биназа оказывала цитотоксическое действие на злокачественные клетки, сопоставимое с действием блеомицина: доля апоптотических клеток A549 после 24 ч культивирования с биназой в концентрации 4,15 мкМ и 25 мкМ составила 11% и 40%, соответственно, в то время как для необработанных клеток данный показатель не превышал 9% (рис. 2А).

Оценка цитотоксичности комплекса биназы и блеомицина проведена нами в сочетаниях определённой концентрации одного компонента с возрастающей концентрацией другого. Доля клеток в апоптозе за 24 ч действия 0,1 мкМ и 7 мкМ блеомицина составило 6% и 24%, соответственно. При одновременном воздействии 0,1 мкМ блеомицина и 4,15 мкМ биназы доля клеток в состоянии апоптоза составила 22%. При использовании более высокой концентрации биназы (0,1 мкМ блеомицина/25 мкМ биназы) доля клеток в состоянии апоптоза достигала 31% (рис. 2А). Однако даже в этом случае уровень апоптоза был ниже, чем при использовании только биназы: при обработке биназой в концентрации 25 мкМ доля клеток в состоянии апоптоза составила 40% (рис. 2А). Таким образом, сочетание низкой малотоксичной концентрации блеомицина с высокой концентрацией биназы неэффективно.

Сочетание низкой концентрации биназы (4,15 мкМ) с возрастающими концентрациями

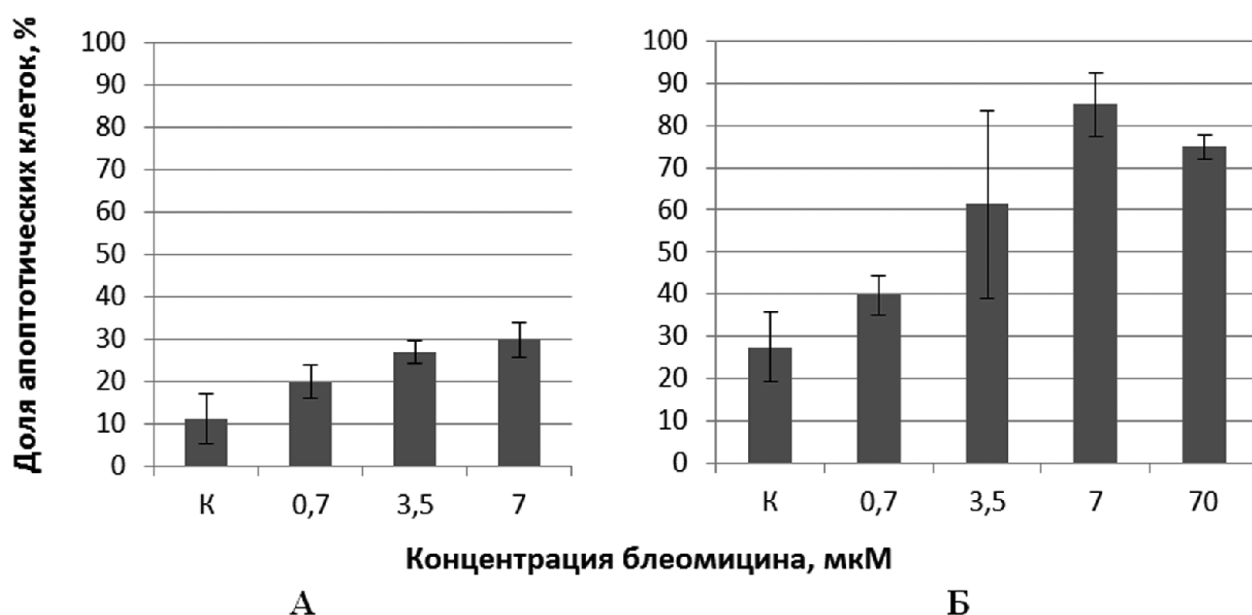


Рисунок 1. Индуцирующее апоптоз действие блеомицина после 24 ч (А) и 72 ч (Б) его действия на клетки аденокарциномы лёгких человека A549.

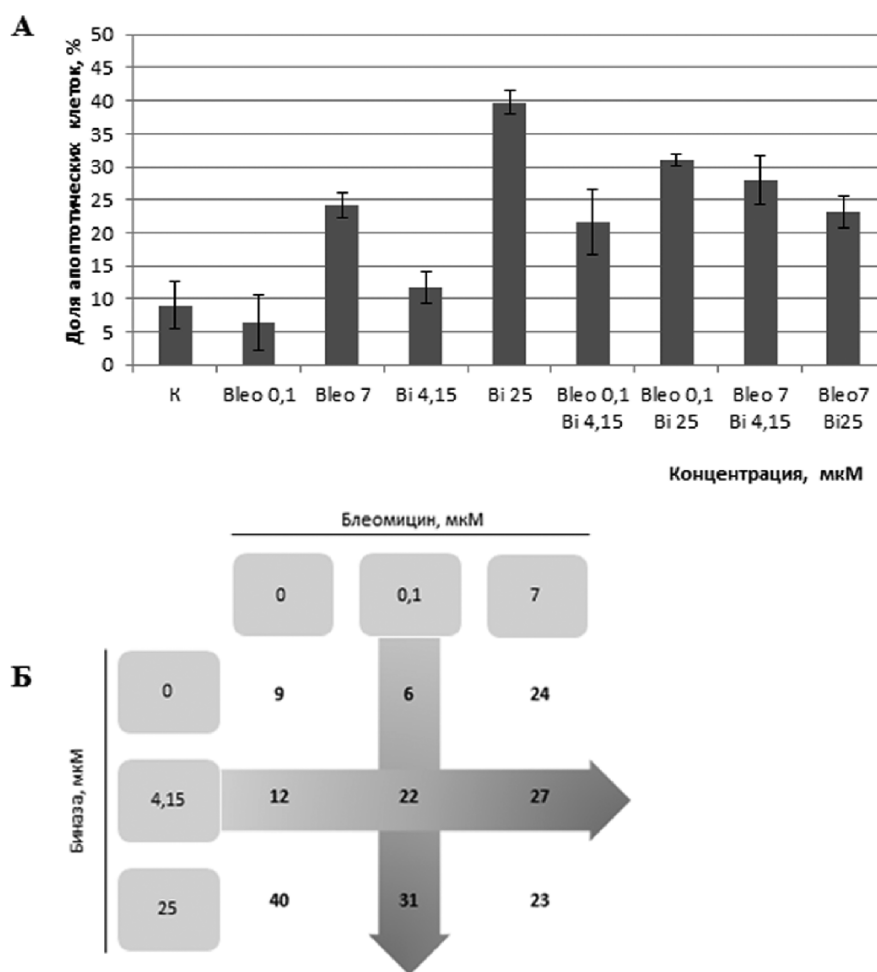


Рисунок 2. Сочетанное индуцирующее апоптоз действие блеомицина (Bleo) с биназой (Bi) на клетки аденокарциномы лёгких человека A549 после 24 ч инкубации.

блеомицина (0,1 и 7 мкМ) привело к переходу в апоптоз 22% и 27% клеток, соответственно. Отметим, что совместное воздействие максимальных использованных в работе концентраций исследуемых веществ было неэффективно (23% клеток в состоянии апоптоза), в то время как сочетание неапоптогенных концентраций привело к повышению доли апоптотических клеток до 22% по сравнению с индивидуальным действием блеомицина (6%) и биназы (12%) (рис. 2Б). Полученные данные свидетельствуют, что биназа и блеомицин эффективны при сочетании в низких концентрациях и неэффективны при сочетании в высоких.

Молекулярные механизмы действия исследуемых соединений имеют ряд общих черт. Так, при действии блеомицина пневмоциты MLE-12 и первичные альвеолярные клетки типа II подвергаются апоптозу по митохондриальному пути, ассоциированном с активацией стрессовой киназы JNK и проапоптотических белков Bak и Bax [17]. С другой стороны, имеются данные, подтверждающие активацию блеомицином каспазы-8 и индукцию апоптоза первичных клеток эпителия бронхов и эндотелиальных клеток лёгочной артерии по внешнему пути [18]. Апоптоз, индуцируемый биназой, также сочетает внешний и внутренний пути [5].

Блеомицин помимо деструкции ДНК вызывает фрагментацию тРНК, при этом вторая реакция является более специфичной [10]. Механизм его действия на уровне РНК отчасти сходен с таковым для цитотоксической онконазы, которая проявляет свои противоопухолевые свойства, ингибируя синтез белка за счёт деградации одной или нескольких тРНК; предполагают, что оба противоопухолевых препарата специфически расщепляют тРНК^{Lys} и тРНК^{Phe} [19, 20]. Для биназы каталитическая активность также является важным фактором проявления противоопухолевого действия [21-23]. Возможно, что сочетание биназы с блеомицином в высоких концентрациях приводит к конкуренции этих рибонуклеолитических агентов за связывание с доступной клеточной РНК и соответствующему снижению апоптогенной активности, чего не происходит при их комбинации в низких концентрациях.

Исследованный в комплексе с онконазой противоопухолевый антибиотик доксорубин взаимодействует с ДНК и нарушает опосредованную топоизомеразой II репарацию. Кроме того, доксорубин повреждает ДНК вследствие генерации свободных радикалов, ведущих к окислительному стрессу и апоптозу [24]. *In vitro* комбинация онконазы и доксорубина оказалась более токсичной

для клеток диффузной крупноклеточной лимфомы, чем каждый из препаратов в отдельности: цитотоксический индекс онконазы, доксорубицина и комбинации этих препаратов составил 25%, 15% и 35%, соответственно [25]. Согласно проведенному нами анализу апоптотических клеток аденокарциномы лёгких, аналогичные значения для биназы, блеомицина и их комбинации составили 12%, 6% и 22%, что даёт основание считать перспективным дальнейшее исследование их комбинированного действия.

Работа выполнена в соответствии с Программой повышения конкурентоспособности Казанского федерального университета и поддержана грантом РФФИ 14-14-00522.

ЛИТЕРАТУРА

1. Ulyanova V., Vershinina V., Ilinskaya O. (2011) FEBS J., **278**, 3633-3643.
2. Ilinskaya O., Decker K., Koschinski A., Dreyer F., Repp H. (2001) Toxicology, **156**, 101-107.
3. Mitkevich V.A., Petrushanko I.Yu., Kretova O.V., Spirin P.V., Zelenikhin P.V., Prassolov V.S., Tchurikov N.A., Ilinskaya O.N., Makarov A.A. (2010) Cell Cycle, **9**, 2674-2678.
4. Mitkevich V.A., Petrushanko I.Yu., Spirin P.V., Fedorova T.V., Kretova O.V., Tchurikov N.A., Prassolov V.S., Ilinskaya O.N., Makarov A.A. (2011) Cell Cycle, **10**, 4090-4097.
5. Mitkevich V.A., Kretova O.V., Petrushanko I.Y., Burnysheva K.M., Sosin D.V., Simonenko O.V., Ilinskaya O.N., Tchurikov N.A., Makarov A.A. (2013) Biochimie, **95**, 1344-1349.
6. Altomare D.A., Rybak S.M., Pei J., Maizel J.V., Cheung M., Testa J.R., Shogen K. (2010) BMC Cancer, **10**, DOI:10.1186/1471-2407-10-34.
7. Porta C., Paglino C., Mutt L. (2008) Biologics, **2**, 601-609.
8. Mikulski S.M., Newton D.L., Wiltrout R.H., Rybak S.M. (1999) Proc. Am. Assoc. Cancer Res., **40**, 491-492.
9. Cabrera-Fuentes H.A., Aslam M., Saffarzadeh M., Kolpakov A., Zelenikhin P., Preissner K.T., Ilinskaya O.N. (2013) Toxicon, **69**, 219-226.
10. Abraham A.T., Lin J., Newton L., Rybak S., Hecht S.M. (2003) Chem. Biol., **10**, 45-52.
11. Schulga A., Kurbanov F., Kirpichnikov M., Protasevich I., Lobachev V., Ranjbar B., Chekhov V., Polyakov K., Engelborghs Y., Makarov A. (1998) Protein Eng., **11**, 775-782.
12. Yakovlev G.I., Moiseyev G.P., Struminskaya N.K., Borzykh O.A., Kipenskaya L.V., Znamenskaya L.V., Leschinskaya I.B., Chernokalskaya E.B., Hartley R.W. (1994) FEBS Lett., **354**, 305-306.
13. Ilinskaya O.N., Ivanchenko O.B., Karamova N.S., Kipenskaya L.V. (1996) Mutat. Res., **354**, 203-209.
14. Laakko T., King L., Fraker P. (2002) J. Immunol. Methods., **261**, 129-139.
15. Burger R.M. (1998) Chem. Rev., **98**, 1153-1170.
16. Carter B.J., de Vroom E., Long E.C., Van der Marel G.A., Van der Boom J.H., Hecht S.M. (1990) Proc. Nat. Acad. Sci. USA, **87**, 9373-9377.
17. Lee V.Y., Schroedl C., Brunelle J.K., Buccellato L.J., Akinci O.I., Kaneto H., Snyder C., Eisenbart J., Budinger G.R.S., Chandel N.S. (2005) Am. J. Physiol. Lung. Cell. Mol. Physiol., **289**, 521-528.
18. Mungunsukh O., Griffin A.J., Lee Y.H., Day R.M. (2010) Am. J. Physiol. Lung. Cell. Mol. Physiol., **298**, 696-703.
19. Tao Z., Konishi K., Keith G., Hecht S.M. (2006) J. Am. Chem. Soc., **128**, 14806-14807.
20. Suhasini A.N., Sirdeshmukh R. (2006) J. Biol. Chem., **281**, 12201-12209.
21. Makarov A.A., Ilinskaya O.N. (2003) FEBS Lett., **540**, 15-20.
22. Makarov A.A., Kolchinsky A., Ilinskaya O.N. (2008) BioEssays, **30**, 781-790.
23. Миткевич В.А., Макаров А.А., Ильинская О.Н. (2014) Мол. биол., **48**, 214-219.
24. Thorn C.F., Oshiro C., Marsh S., Hernandez-Boussard T., McLeod H., Klein T.E., Altman R.B. (2011) Pharmacogenet. Genomics, **21**, 440-446.
25. Majchrzak A., Witkowska M., Medra A., Zwolinska M., Bogusz J., Cebula-Obrzut B., Darzynkiewicz Z., Robak T., Smolewski P. (2013) Postepy Hig. Med. Dosw., **67**, 1166-1172.

Поступила: 25. 08. 2014.
Принята к печати: 03. 02. 2016.

COMBINED ACTION OF BINASE AND BLEOMYCIN TOWARD HUMAN LUNG ADENOCARCINOMA CELLS

P.V. Zelenikhin¹, A.V. Makeeva¹, T.N. Nguen¹, Y.A. Siraj^{1,2}, O.N. Ilinskaya¹

¹Kazan (Volga Region) Federal University,

18 Kremlyovskaya str., Kazan, 420008 Russia; tel.: (843)233-78-84; e-mail: pasha_mic@mail.ru

²College of Medicine and Health Sciences, Bahir Dar University, Bahir Dar, 79, Ethiopia

Some microbial ribonucleases (RNases) demonstrate selective cytotoxic effect against a wide range of tumor cells. In this context combined use of cytotoxic RNases in complex therapy with other chemotherapeutic agents appears to be especially promising. In this study we have investigated the apoptosis-induced effect of *Bacillus pumilus* RNase (binase) in combination with known anti-tumor antibiotic bleomycin on human lung adenocarcinoma A549 cells. The combined effect of high concentrations of these agents did not have any mutual increase in their apoptosis-induced action, while a combination of non-apoptotic concentrations resulted in the increase of the proportion of apoptotic cells up to 22% as compared with individual effect of bleomycin (6%) and binase (12%) used separately. These results indicate that binase and bleomycin are effective in combination of their low concentrations and ineffective in combination of their high concentrations.

Key words: cytotoxic ribonucleases, *Bacillus pumilus*, binase, bleomycin, antitumor activity, lung adenocarcinoma