

УДК 577.151: 547.022

DOI: 10.31040/2222-8349-2018-3-3-14-17

ОЦЕНКА ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ ХИТОЗАНОВ С БАКТЕРИАЛЬНОЙ РИБОНУКЛЕАЗОЙ БИНАЗОЙ

© П.В. Зеленихин, М.И. Сабирова, А.И. Надырова, А.И. Колпаков, О.Н. Ильинская

Секретируемая рибонуклеаза *Bacillus pumilus*, биназа, обладает противоопухолевой и противовирусной активностью, что обуславливает перспективы ее использования в терапии. Создание терапевтических препаратов с пролонгированным действием, обусловленным включением действующего вещества в инертный и биосовместимый носитель, особенно важно для препаратов на основе белков, которые в организме утрачивают свою активность вследствие действия внутриклеточных протеаз и ряда других факторов. Потенциальным носителем может выступать производное хитина – хитозан, который малотоксичен и может быть гидролизован ферментами организма до олигосахаридов и глюкозамина с высвобождением действующего вещества.

Настоящее исследование проведено с целью оценки возможности применения хитозанов как носителей бактериальной РНКазы биназы, обеспечивающих длящийся во времени выход фермента с целевым противовирусным и противоопухолевым действием.

Оценку комплексообразования фермента с высокомолекулярным катионным хитозаном, анионным сукциноилхитозаном и низкомолекулярным олигохитозаном проводили, определяя каталитическую активность биназы в фильтрате, полученном пропусканием через ультрафильтр 30 кДа (Vivaspin) смеси фермента с хитозанами. Все исследованные хитозаны оказались абсолютно инертными по отношению к биназе: они не сорбировали фермент и не снижали его каталитической активности.

Ключевые слова: Хитозан, *Bacillus pumilus*, РНКазы, биназа, каталитическая активность.

Введение. Современная биомедицина активно исследует системы доставки терапевтических препаратов для обеспечения пролонгированного действия последних. Для ряда заболеваний уникальные молекулярные мишени целевого воздействия препаратов неизвестны, либо не до конца изучены, вследствие чего практическая медицина нуждается в разработке биосовместимых инертных носителей, отличных от таргетных комплексов препаратов с мишень-специфичными антителами. В качестве матриц для создания таких систем используют биополимеры и наночастицы различной природы, характеризующиеся низкой иммуногенностью. Одним из перспективных материалов

для создания систем доставки лекарств является хитозан-деацетилированное производное природного полисахарида хитина. С одной стороны, наличие реакционноспособных гидроксильных и аминогрупп в молекуле хитозана способствует созданию комплексов с лекарственными препаратами, с другой стороны, хитозан малотоксичен и может быть гидролизован ферментами организма до олигосахаридов и глюкозамина с высвобождением действующего вещества.

В данной работе в качестве действующего вещества была использована рибонуклеаза *Bacillus pumilus*, биназа, для которой ранее нами установлены противоопухолевая и противовирусная активности [1, 2]. Этот фермент

ЗЕЛЕНИХИН Павел Валерьевич, Казанский (Приволжский) федеральный университет,

e-mail: pasha_mic@mail.ru

САБИРОВА Миляуша Ильсуровна, Казанский (Приволжский) федеральный университет,

e-mail: mil.sabirowa@yandex.ru

НАДЫРОВА Алсу Ильдаровна, Казанский (Приволжский) федеральный университет,

e-mail alsu.nadirova@yandex.ru

КОЛПАКОВ Алексей Иванович, Казанский (Приволжский) федеральный университет,

e-mail: ljoscha@mail.ru

ИЛЬИНСКАЯ Ольга Николаевна, Казанский (Приволжский) федеральный университет,

e-mail: ilinskaya_kfu@mail.ru

селективно ингибирует рост клеток, экспрессирующих *ras*, *kit* и AML-ETO онкогены, при этом не оказывая значимого токсического действия на нормальные клетки [3]. Кроме того, биназа не индуцирует поликлональный Т-клеточный ответ, что говорит о ее низкой иммуногенности [4]. Перечисленные свойства позволяют рассматривать биназу в качестве потенциального противоракового препарата. Название «биназа» исторически связано с устаревшим названием штамм-продуцента этой рибонуклеазы – *Bacillus intermedius*, который в результате современного молекулярно-генетического анализа был переопределен нами как *Bacillus pumilus*, и внесен в базу данных (GenBank Accession No. HQ650161.1) [5].

Некоторые РНКазы, в частности, онконаза ооцитов леопардовой лягушки и BS-РНКазы семенников быка уже охарактеризованы как потенциальные противоопухолевые и противовирусные препараты [2]. Отметим, что клиническое применение РНКаз млекопитающих не всегда эффективно, поскольку их каталитическая активность блокируется специфическим ингибитором, представленным практически во всех тканях и клетках и необходимым для защиты клетки от собственных РНКаз. Бактериальные РНКазы этим ингибитором не инактивируются, а огромные возможности создания на их основе простых биоинженерных конструкций делают их особо привлекательными для разработки новых терапевтических средств. Однако при введении чужеродных ферментов в живой организм они утрачивают свою активность вследствие действия внутриклеточных протеаз и ряда других факторов, что обуславливает актуальность поиска носителей терапевтических белков.

Значительные экономические потери от ежегодных вирус-индуцированных эпидемий обуславливают постоянный поиск новых противовирусных средств, поскольку стандартные препараты из-за высокой варибельности вирусов со временем становятся бесполезными. В области использования противоопухолевых средств таргетное блокирование онкогенных мишеней не всегда эффективно, поскольку индуцирует включение обходных путей, ведущих к пролиферации опухолевых клеток [6]. Изучение молекулярного механизма действия противовирусного и противоопухолевого действия РНКаз несомненно является важной задачей, решение которой может способствовать разра-

ботке новых эффективных препаратов. Однако, именно вопросы пролонгированного действия фермента с рибонуклеолитической активностью, который не вызывает резистентности опухолевых или вирус-инфицированных клеток к собственному цитотоксическому действию, обуславливают актуальность задач, связанных с длительным, поэтапным воздействием препарата на вирус-инфицированные либо опухолевые клетки. Настоящее исследование не касается специфичных механизмов действия бактериальных РНКаз как противовирусных и противоопухолевых средств, но рассматривает возможность применения хитозанов как носителей последних, обеспечивающих длительно во времени выход фермента с целевым действием в отношении пораженного инфекцией или онкогенной модификацией организма.

Материалы и методы исследования.
РНКазы. Биназа – гуанилспецифичная РНКазы *B. pumilus* 7P (молекулярная масса мономера 12.2 кДа, 109 аминокислотных остатков, рI 9.5) – выделена в гомогенном виде из культуральной жидкости нативного продуцента согласно процедуре, описанной Дудкиной с соавт. [7]. Установлено, что биназа является природным димером [8].

Хитозан. В работе использованы три различных образца хитозана, предоставленные С.Н. Куликовым («Казанский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии» федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека): I – Высокомолекулярный хитозан. Молекулярная масса ~600 kDa, степень деацетилирования ~60%; II – Узкодисперсный олигохитозан. Молекулярная масса 22 kDa, степень деацетилирования 58%; III – Сукциноил-хитозан. Молекулярная масса ~200 kDa, модифицирован сукциноильными группами, имеет отрицательный заряд.

Взаимодействие биназы с хитозаном. Хитозаны смешивали с РНКазой в 0.01M фосфатном буфере при pH 7.2 и 9.0. Во всех случаях хитозаны были в значительном избытке. Конечная концентрация биназы составила 300 мкг/мл, хитозанов 25 мг/мл. После смешивания смесь инкубировали при комнатной температуре в течение 1 ч, затем подвергали ультрафильтрации при помощи 30 кДа фильтров Vivaspin. В получившемся ультрафильтрате определяли РНКазную активность. В качестве ва-

рианта сравнения использовали 300 мкг/мл раствор биназы в соответствующем буфере.

Каталитическая активность биназы. Определение РНКазной активности проводили по количеству кислоторастворимых продуктов гидролиза высокополимерной дрожжевой РНК [7]. Реакционную смесь, состоящую из 0.05 мл ферментного раствора, 0.25 мл РНК (1 мг/мл) и 0.2 мл 0.25M Трис-НСl буфера (рН 8.5) инкубировали 15 мин при температуре 37°C на водяной бане («Biosan», Латвия). Реакцию останавливали добавлением 0.1 мл охлажденного 0.75%-ного раствора уранилцетата в 25%-ной хлорной кислоте. После 10-минутного выдерживания во льду осадок удаляли центрифугированием при 12000g в течение 2 минут («Eppendorf», Германия). Отбирали 0.2 мл надосадочной жидкости, разводили в 20 раз дистиллированной водой и измеряли поглощение УФ раствором при 260 нм на спектрофотометре («Bio-Rad», США). В контрольные пробы (Ks) вместо ферментного раствора добавляли дистиллированную воду. За единицу РНКазной активности принимали количество фермента, которое вызывает увеличение оптической плотности в опытных пробах по сравнению с контрольными на 1 оптическую единицу за 1 час инкубации в пересчете на 1 мл ферментного раствора.

Результаты. Инкубирование каталитически активной биназы (300 мкг/мл) с избытком различных хитозанов в течение часа предполагало, что фермент с носителем образует комплекс. В дальнейшем фильтрация смеси через поры, пропускающие молекулы с молекулярным весом 30 кДа, должна привести к выходу фермента (молекулярная масса димера 24,4 кДа) в фильтрат, где сравнение его активности по сравнению с исходной покажет, насколько последняя понизилась за счет связывания биназы с хитозаном. Положительно заряженный высокомолекулярный деацетилированный хитозан I (600 кDa) и отрицательно заряженный сукциноилхитозан III (200 кDa) не могут пройти через поры, в то вре-

мя как узкодисперсный олигохитозан II (22 кDa), не связавшийся с белком, окажется в фильтрате. Таким образом, определение рибонуклеолитической активности в фильтрате дает ответ на вопросы, является ли высокомолекулярный хитозан перспективным носителем для биназы; зависит ли сорбция фермента от зарядовых свойств хитозана, и может ли низкомолекулярный хитозан ингибировать каталитическую активность фермента.

Результаты работы свидетельствуют, что за 1ч инкубации биназа не образовала комплексов ни с одним из исследованных видов хитозана ни при нейтральном, ни при щелочном рН (табл. 1).

Низкомолекулярный олигохитозан II в случае образования комплекса с биназой так же, как и высокомолекулярные хитозаны, не поступил бы в фильтрат, поскольку молекулярный вес предполагаемого комплекса не допускает его проникновение через поры, пропускающие молекулы массой до 30 кДа. Однако, в свободном виде он проходит через фильтр и при определении рибонуклеолитической активности фильтрата дает возможность оценить, снижает ли его присутствие активность биназы по отношению к высокополимерной дрожжевой РНК. Установлено, что активность фермента в присутствии олигохитозана II не уменьшается. Ранее было показано, что присутствие низкомолекулярного олигохитозана в реакционной смеси снижает активность РНКазы *Bacillus intermedius*, то есть биназы, определенную по отношению к полицитидиловой кислоте poly(I) [10]. Однако, использование синтетического субстрата при неоптимальном для рибонуклеолитической активности рН 7 в присутствии NaCl и этилендиаминтетрауксусной кислоты (EDTA) могло привести к хелатированию анионного субстрата, вследствие чего он оказался недоступен для каталитического расщепления РНКазой, что и привело к снижению уровня ее активности.

Т а б л и ц а 1

Рибонуклеазная активность в ультрафильтрах после инкубации биназы с хитозанами

Вариант инкубации	Активность биназы, опт.ед/мл×час*	
	рН 7.2	рН 9.0
Хитозан I + биназа	115000 ± 800	129500 ± 900
Хитозан II+ биназа	129000 ± 920	127000 ± 1000
Хитозан III+ биназа	155000 ± 1150	148000 ± 1300
Биназа (контроль)	115000 ± 800	115500 ± 700

Примечание. * представлены средние значения трех измерений из двух независимых экспериментов.

Согласно результатам настоящей работы, все исследованные хитозаны оказались абсолютно инертными по отношению к биназе: они не сорбируют фермент и не снижают его каталитической активности.

Исследование выполнено в рамках Программы повышения конкурентоспособности Казанского (Приволжского) федерального университета Министерства образования и науки РФ и поддержано грантом РФФИ 17-00-00060.

Литература

1. Makarov A.A., Kolchinsky A., Ilinskaya O.N. Binase and other microbial RNases as potential anti-cancer agents // *BioEssays* 2008. V. 30. P. 781-790.
2. Ilinskaya O.N., Shah Mahmud R. Ribonucleases as antiviral agents // *Molecular Biology* 2014. V.48. №5. P. 615–623.
3. Mitkevich V.A. et al. Sensitivity of acute myeloid leukemia Kasumi-1 cells to binase toxic action depends on the expression of KIT and AML1-ETO oncogenes // *Cell Cycle*. 2011. V.10. P. 4090-4097.
4. Zelenikhin P.V. et al. Binase induces apoptosis of transformed myeloid cells and does not induce T-cell immune response // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2007. V.361. P. 1000-1005.
5. Ulyanova V., Vershinina V., Ilinskaya O. Barnase and binase: twins with distinct fates // *FEBS J.* 2011. V.278. P.3633-3643.
6. Ciliberto D. et al. The best strategy for RAS wild-type metastatic colorectal cancer patients in first-line treatment: A classic and Bayesian meta-analysis // *Crit. Rev. Oncol. Hematol.* 2018. V.125. P. 69-77.
7. Dudkina E. et al. Three-step procedure for preparation of pure *Bacillus altitudinis* ribonuclease // *FEBS Open Bio.* 2016. V.6. P.24-32.
8. Dudkina E. et al. New insight into secreted ribonuclease structure: binase is a natural dimer // *PLoS ONE.* 2014. V.9. e115818.
9. Zubareva A.A. et al. Protein delivery by nanoparticles formed by chitosan-N-acyl derivatives // *Progress in the Chemistry and Application of Chitin and its Derivatives.* 2011. V.XVI. P. 61-70.
10. Yakovlev G.I. et al. Low molecular weight chitosan is an efficient inhibitor of ribonucleases // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2007. V.357. P. 584–588.



EVALUATION OF CHITOSANS INTERACTION WITH BACTERIAL RIBONUCLEASE BINASE

© P.V. Zelenikhin, M.I. Sabirova, A.I. Nadirova, A.I. Kolpakov, O.N. Ilinskaya

Kazan (Volga-region) Federal University,
420008, Kremlevskaya str., 18, Kazan, Russia

The secreted *Bacillus pumilus* ribonuclease, binase, has antitumor and antiviral activity, which causes the prospects of its use in therapy. The development of therapeutic drugs with a prolonged action due to the inclusion of the active substance in an inert and biocompatible carrier is especially important for protein-based preparations that lose their activity in the body due to the action of intracellular proteases and a number of other factors. The potential carrier can be a chitin derivative, chitosan, which is low-toxic and can be hydrolysed by the body's enzymes to oligosaccharides and glucosamine to release the active ingredient.

The present study was conducted to assess the possibility of using chitosans as carriers of bacterial RNase binase, providing a time-passing enzyme release with the targeted antiviral and antitumor effect.

The complexation of the enzyme with high-molecular cationic chitosan, anionic succinoyl chitosan, and a low-molecular oligochitosan was evaluated by determining the catalytic activity of binase in a filtrate obtained by passing the mixture of the enzyme with chitosans through a 30 kDa (Vivaspin) ultrafilter. All the investigated chitosans were absolutely inert with respect to the binase: they did not adsorb the enzyme and did not reduce its catalytic activity.

Key words: Chitosan, *Bacillus pumilus*, RNase, Binase, catalytic activity.