

Министерство науки и высшего образования Российской Федерации  
Федеральное государственное автономное образовательное учреждение  
высшего образования «Казанский (Приволжский) федеральный университет»  
Институт фундаментальной медицины и биологии  
Кафедра микробиологии

Направление подготовки (специальность): 06.04.01 – Биология

Профиль (специализация, магистерская программа): Микробиология и вирусологии

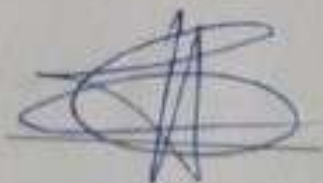
МАГИСТЕРСКАЯ ДИССЕРТАЦИЯ  
СОЧЕТАННАЯ ЦИТОТОКСИЧЕСКАЯ АКТИВНОСТЬ РНКАЗЫ *BACILLUS*  
*PUMILUS* И ПРОТИВООПУХОЛЕВЫХ АНТИБИОТИКОВ

Обучающийся 2 курса  
группы 01-240-2



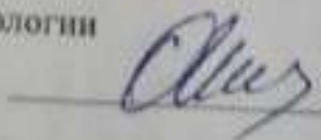
А.О. Хабибрахманова

Научный руководитель  
канд. биол. наук, доцент



П.В. Зеленыхин

Заведующий кафедрой микробиологии  
д-р биол. наук, профессор



О.Н. Ильинская

## СОДЕРЖАНИЕ

	стр.
<b>СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ</b>	4
<b>ВВЕДЕНИЕ</b>	6
<b>1 ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ</b>	8
1.1 Механизмы действия противоопухолевых препаратов	8
1.1.1 Доксорубицин - агент с множественными механизмами противораковой активности	9
1.1.1.1 Образование аддуктов DOX-ДНК и интеркаляция в ДНК	10
1.1.1.2 Индукция образования АФК и апоптоза	10
1.1.1.3 Индукция старения	12
1.1.1.4 Другие типы гибели клеток, индуцируемые доксорубицином	13
1.1.2 Механизм действия 5-фторурацила	14
1.1.2.1 Влияние 5-ФУ на РНК	15
1.2 Биологическая активность РНКаз	16
1.3 Сочетанная терапия	17
<b>ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ</b>	22
<b>2 МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ</b>	22
2.1 Используемые в экспериментальной работе материалы	22
2.1.1 Тестируемые агенты	22
2.1.2 Клеточные культуры	23
2.2 МТТ-тест как колориметрическое определение жизнеспособности клеток ВТ-20 и HBL-100	25

2.3	Характеристика сочетанного действия препаратов	26
	Цитометрическое определение апоптозиндуцирующей	
2.4	активности эффективных сочетаний препаратов в сравнении с	29
	монообработкой	
2.5	Статистическая обработка данных	31
<b>3</b>	<b>РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ</b>	<b>32</b>
3.1	Цитотоксическая активность биназы в отношении клеток BT-20	32
	и HBL-100	
3.2	Цитотоксическая активность доксорубина в отношении	33
	клеток BT-20 и HBL-100	
3.3	Цитотоксическая активность 5-фторурацила в отношении	35
	клеток BT-20 и HBL-100	
3.4	Сочетанное действие биназы и доксорубина на клетки BT-20	36
	и HBL-100	
3.5	Сочетанное действие биназы и 5-фторурацила на клетки BT-20	39
	и HBL-100	
3.6	Определение способности сочетаний биназы и доксорубина	40
	индуцировать апоптоз клеток HBL-100	
	<b>ВЫВОДЫ</b>	<b>44</b>
	<b>СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ</b>	<b>45</b>

## ВВЕДЕНИЕ

Рак молочной железы – самая распространенная злокачественная опухоль у женщин. По статистике Всемирной организации здравоохранения, в 2020 году было зарегистрировано около 2.3 миллиона новых случаев рака молочной железы, что составляет 11.7% всех случаев рака [Sung *et al.*, 2021]. Это основная причина смертности от рака среди женщин во всем мире, налагающая значительное бремя как на здравоохранение, так и на экономику. Рак молочной железы — гетерогенное заболевание, имеющее различные молекулярные подтипы, демонстрирующие различные биологические и клинические характеристики.

Хотя монотерапия применяется уже много лет, она часто неэффективна, и у многих пациентов после первоначального лечения возникает рецидив. Более того, у некоторых пациентов ответ на терапию становится слабее или со временем развивается резистентность к монотерапии. Это особенно проблематично для метастатического рака молочной железы или трижды негативного рака молочной железы [Liang *et al.*, 2020].

Цитотоксичность современных противоопухолевых препаратов способна приводить к тяжелым побочным эффектам у пациентов, которые вынуждены принимать их в высоких дозах. Таким образом, всегда существует необходимость в поиске либо новых противоопухолевых агентов, либо эффективных сочетаний уже известных, в которых сочетается достаточный уровень противоопухолевой активности с минимальными побочными эффектами. В последнее время комбинированная терапия стала многообещающим новым вариантом лечения. Такой подход чаще намного эффективнее, чем монотерапия, и демонстрирует более низкий уровень токсичности при длительном лечении.

Одним из возможных вариантов сочетанной терапии может быть использование комбинаций противоопухолевых антибиотиков и

цитотоксичных рибонуклеаз (РНКаз), которые способны индуцировать гибель клеток опухолей различных типов [Zelenikhin *et al.*, 2005; Mitkevich *et al.*, 2013; Garipov *et al.*, 2014], включая трудно поддающиеся терапии трижды негативные опухоли молочной железы [Zelenikhin *et al.*, 2016] различных организмов.

В связи с вышесказанным, целью настоящей работы является оценка сочетанной цитотоксичности биназы и противоопухолевых антибиотиков доксорубицина и 5-фторурацила в отношении линии клеток карцином молочной железы BT-20 и HBL-100.

Для достижения поставленной цели решались следующие задачи:

1) Определить цитотоксическую активность биназы и противоопухолевых антибиотиков в варианте монообработки в отношении клеток BT-20 и HBL-100 в МТТ-тесте;

2) Охарактеризовать сочетанное действие биназы и противоопухолевых антибиотиков на клетки BT-20 и HBL-100, выявить зоны синергии, аддитивности и антагонизма агентов.

3) Охарактеризовать апоптозиндуцирующую активность эффективных сочетаний препаратов в сравнении с монообработкой при помощи проточной цитофлуориметрии.

## ВЫВОДЫ

1) Охарактеризована цитотоксичность биназы, доксорубицина и 5-фторурацила в варианте монообработки по отношению к клеткам HBL-100 и BT-20. Было установлено, что биназа и 5-фторурацил не обладали существенной цитотоксической активностью по отношению как к клеткам HBL-100, так и к клеткам BT-20. Значительной токсичностью обладал доксорубин, показатель  $IC_{50}$  которого для клеток BT-20 и HBL-100 составил 1.4 мкг/мл и 0.23 мкг/мл, соответственно.

2) Определены параметры сочетанного действия биназы и противоопухолевых антибиотиков на жизнеспособность клеток карцином молочной железы BT-20 и HBL-100. В отношении клеток BT-20 исследованные сочетания биназы и доксорубицина проявили только антагонистическое взаимодействие во всем диапазоне исследованных комбинаций. В отношении клеток HBL-100 были выявлены зоны синергии, аддитивности и антагонизма, в большинстве исследованных комбинаций преобладал антагонизм. Сочетания биназы и 5-фторурацила в отношении обеих клеточных линий проявили в основном антагонистический эффект, однако для клеток HBL-100 были выявлены зоны аддитивности, которые наблюдались в зоне высоких концентраций биназы и 5-фторурацила.

3) При помощи проточной цитофлуориметрии была охарактеризована способность биназы, доксорубицина и их комбинаций с выраженным синергетическим действием индуцировать апоптоз в клетках HBL-100. Было обнаружено, что при совместном воздействии на клетки апоптоз-индуцирующее действие исследованных агентов выше, чем в варианте монообработки, что позволяет сделать заключение о способности биназы потенцировать апоптогенное действие доксорубицина на клетки трижды негативного рака молочной железы HBL-100.