

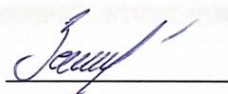
Министерство науки и высшего образования Российской Федерации
Федеральное государственное автономное образовательное учреждение
высшего образования «Казанский (Приволжский) федеральный университет»
Институт фундаментальной медицины и биологии
Кафедра микробиологии

Направление подготовки (специальность): 06.04.01 – Биология

Профиль (специализация, магистерская программа): Микробиология и вирусология

МАГИСТЕРСКАЯ ДИССЕРТАЦИЯ
ЦИТОТОКСИЧЕСКОЕ И АНТИМИГРАЦИОННОЕ ДЕЙСТВИЕ
СОЧЕТАННЫХ ПРЕПАРАТОВ ПРОТИВООПУХОЛЕВЫХ
АНТИБИОТИКОВ И БИНАЗЫ НА КЛЕТКИ КАРЦИНОМ
КИШЕЧНИКА

Обучающийся 2 курса
группы 01-040-2



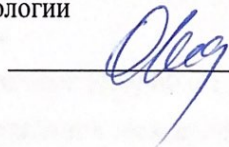
А.Ю. Зелинская

Научный руководитель
канд. биол. наук, доцент



П.В. Зеленихин

Заведующий кафедрой микробиологии
д-р биол. наук, профессор



О.Н. Ильинская

Казань – 2022

СОДЕРЖАНИЕ

	стр.
СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ	5
ВВЕДЕНИЕ	6
1 ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ	8
1.1 Биологическая активность рибонуклеаз	8
1.1.1 Цитотоксичные РНКазы различных организмов	10
1.1.2 Механизмы цитотоксичности РНКаз	14
1.2 Противоопухолевая химиотерапия	17
1.2.1 Классификация противоопухолевых препаратов	18
1.2.2 Характеристика антибиотиков антрациклинового ряда	26
1.2.2.1 Механизмы действия антрациклиновых антибиотиков	27
1.2.2.2 Характеристика противоопухолевого действия доксорубицина	28
1.2.3 Характеристика противоопухолевых антибиотиков группы блеомицинов	29
1.3 Методы оценки жизнеспособности клеток	31
1.3.1 Методы экспресс-окраски	31
1.3.2 Колориметрические методы	31
1.3.3 Методы проточной цитометрии	32
1.4 Методы оценки антимиграционной активности клеток	32
1.4.1 Анализ в камере Бойдена	33
1.4.2 Барьерный анализ	33
1.4.3 Микрожидкостные системы	33
1.4.4 Метод повреждающего штриха	34
ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ	35
2 МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ	35
2.1 Используемые материалы	35
2.1.1 Культивирование линий клеток Hutu 80 и Caco-2	35
2.2 Колориметрическое определение жизнеспособности клеток в МТТ-тесте	36
2.3 Оценка влияния биназы и противоопухолевых антибиотиков (доксорубицин/блеомицин) на способность клеток к миграции	37

2.4	Характеристика сочетанного действия препаратов	37
2.5	Статистическая обработка данных	44
3	РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ	45
3.1	Цитотоксическая активность биназы и доксорубицина в отношении клеток HuTu 80	45
3.1.1	Цитотоксическая активность биназы в отношении клеток HuTu 80	46
3.1.2	Цитотоксическая активность доксорубицина в отношении клеток HuTu 80	46
3.1.3	Цитотоксическая активность блеомицина в отношении клеток HuTu 80	48
3.1.4	Сочетанное действие биназы и доксорубицина на жизнеспособность клеток HuTu 80	49
3.1.5	Сочетанное действие биназы и блеомицина на жизнеспособность клеток HuTu 80	51
3.2	Цитотоксическая активность биназы и доксорубицина в отношении клеток Сасо-2	52
3.2.1	Цитотоксическая активность биназы в отношении клеток Сасо-2	52
3.2.2	Цитотоксическая активность доксорубицина в отношении клеток Сасо-2	54
3.2.3	Цитотоксическая активность блеомицина в отношении клеток Сасо-2	55
3.2.4	Сочетанное действие биназы и доксорубицина на жизнеспособность клеток Сасо-2	57
3.2.5	Сочетанное действие биназы и блеомицина на жизнеспособность клеток Сасо-2	58
3.3	Антимиграционная активность биназы, доксорубицина и блеомицина в отношении клеток HuTu 80	60
3.3.1	Антимиграционная активность биназы в отношении клеток HuTu 80	60
3.3.2	Антимиграционная активность доксорубицина в отношении клеток HuTu 80	62
3.3.3	Антимиграционная активность блеомицина в отношении	

клеток HuTu 80	63
3.3.4. Сочетанное действие биназы и доксорубицина на миграционную активность клеток HuTu 80	65
3.3.5. Сочетанное действие биназы и блеомицина на миграционную активность клеток HuTu 80	66
3.4 Антимиграционная активность биназы, доксорубицина и блеомицина в отношении клеток Сасо-2	67
3.4.1 Антимиграционная активность биназы в отношении клеток Сасо-2	67
3.4.2 Антимиграционная активность доксорубицина в отношении клеток Сасо-2	68
3.4.3 Антимиграционная активность блеомицина в отношении клеток Сасо-2	69
3.4.4. Сочетанное действие биназы и доксорубицина на миграционную активность клеток Сасо-2	71
3.4.5. Сочетанное действие биназы и блеомицина на миграционную активность клеток Сасо-2	72
ВЫВОДЫ	73
СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ	75

ВВЕДЕНИЕ

По данным Всемирной организации здравоохранения, злокачественные новообразования являются причиной каждой шестой смерти. Согласно представлениям современной клеточной биологии, основными механизмами формирования опухолей злокачественного генеза являются аномальный рост и способность малигнизированных клеток к миграции. По оценкам портала Cancer tomorrow, в течение следующих двух десятилетий количество выявляемых случаев вырастет примерно на 50%.

Несмотря на развитие современной онкологии, примерно 50% всех больных лечат с применением хирургических методов и лучевой терапии из-за относительно легкого воздействия на организм [Kanady *et al.*, 2015]. Однако лучевая терапия и хирургическое вмешательство наиболее эффективно используются для лечения злокачественных опухолей, локализованных в определенном органе. С изменением парадигмы понимания рака как системного заболевания, химиотерапия и таргетная терапия, которые используются для уничтожения злокачественных клеток, метастазировавших в отдаленные участки тела, стали играть все более важную роль в лечении онкобольных, однако вместе с тем наиболее остро стали ощущаться проблемы, связанные с приобретенной резистентностью и/или генотоксической природой данных методов.

Таким образом, возникает необходимость создания более эффективных и индивидуальных схем лечения, позволяющих снизить давление побочных эффектов химиотерапевтических препаратов и тем самым повысить вероятность достижения полной ремиссии, облегчить протекание болезни и уменьшить конечную стоимость лечения.

Одним из перспективных направлений является применение противоопухолевых препаратов в комбинации с хирургическим вмешательством, лучевой терапией или сочетанием нескольких агентов с различающимися механизмами действия. Подобный подход основывается на подборе оптимальных доз каждого используемого в комбинации препарата,

что в конечном итоге позволяет повысить эффективность лечения, снизить общую токсичность и уменьшить вероятность развития резистентности к препаратам. Кроме того, комбинации препаратов с пониженными дозами высокотоксичных цитостатиков могут использоваться с целью снижения миграционной активности малигнизированных клеток и локализации опухоли для ее последующего хирургического удаления.

Примером, иллюстрирующим подобные подходы к лечению раковых заболеваний, является применение высокоэффективных противоопухолевых антибиотиков в сочетании с менее токсичными в отношении здоровых клеток противоопухолевыми агентами, например с экстрактами некоторых растений [Yong-Joon Jeon *et al.*, 2018] или различными цитотоксичными РНКазами, в том числе РНКазой *Bacillus pumilus* (биназой) [Zelenikhin *et al.*, 2016].

В связи с вышесказанным целью данной работы является характеристика цитотоксического и антимиграционного действия секретлируемой РНКазы *Bacillus pumilus* и противоопухолевых антибиотиков доксорубицина и блеомицина на линии клеток аденокарцином кишечника человека Hutu 80 и Сасо-2 в вариантах монообработки и в комбинации.

Для достижения поставленной цели решались следующие задачи:

- 1) Оценить цитотоксическую активность биназы, доксорубицина и блеомицина в отношении клеток Hutu 80 и Сасо-2 в МТТ-тесте.
- 2) Охарактеризовать сочетанное действие биназы и противоопухолевых антибиотиков на жизнеспособность линий клеток HуTu 80 и Сасо-2, выявить зоны синергии, аддитивности и антагонизма агентов.
- 3) Оценить антимиграционную активность биназы, доксорубицина и блеомицина в отношении клеток HуTu 80 и Сасо-2 при помощи метода scratch-wound assay.
- 4) Охарактеризовать сочетанное действие биназы и противоопухолевых антибиотиков на миграционную активность клеток HуTu 80 и Сасо-2, выявить зоны синергии, аддитивности и антагонизма агентов.

ВЫВОДЫ

1) Выявлено значительное концентрационно-зависимое цитотоксическое действие рибонуклеазы *Bacillus pumilus* на клетки аденокарцином кишечника. IC_{50} биназы при инкубировании в течение 48 ч составила 50.1 ± 0.57 мкг/мл и 60 ± 0.61 мкг/мл для клеток HuTu 80 и Сасо-2, соответственно.

2) Охарактеризована цитотоксическая активность доксорубина и блеомицина в отношении клеток линий HuTu 80 и Сасо-2. IC_{50} доксорубина при инкубировании в течение 48 ч составила 0.02 ± 0.004 мкг/мл и 0.021 ± 0.006 мкг/мл для клеток HuTu 80 и Сасо-2, соответственно. IC_{50} блеомицина при инкубировании в течение 48 ч составила 120.05 ± 0.006 мкг/мл и 80.34 ± 0.28 мкг/мл для клеток HuTu 80 и Сасо-2, соответственно.

3) Впервые определены параметры сочетанного действия биназы и доксорубина на жизнеспособность клеток аденокарцином кишечника HuTu 80 и Сасо-2. В отношении обеих клеточных линий комбинации препаратов оказывают преимущественно синергическое действие. В отношении клеток HuTu 80 синергизм действия отмечен практически во всем диапазоне исследованных доз препаратов: 10 мкг/мл – 500 мкг/мл для биназы и 0.005 – 1 мкг/мл для доксорубина. Для клеток Сасо-2 после 48 ч воздействия сильная синергия (CI: 0.4–0.65) проявилась для биназы в концентрации 10-500 мкг/мл, в сочетании с доксорубином в концентрации, соответствующей IC_{50} .

4) Впервые определены параметры сочетанного действия биназы и блеомицина на жизнеспособность клеток аденокарцином кишечника HuTu 80 и Сасо-2. В отношении обеих клеточных линий комбинации препаратов оказывают преимущественно синергическое действие. В отношении клеток HuTu 80 синергизм действия отмечен практически во всем диапазоне исследованных доз препаратов, в ряде комбинаций с высокими концентрациями биназы отмечен антагонизм препаратов. Для клеток Сасо-2

после 48 ч воздействия большинство комбинаций показали синергическое действие, в ряде комбинаций отмечается аддитивность препаратов. Также в комбинациях с низкими концентрациями биназы обнаруживается антагонизм препаратов.

5) Охарактеризована способность биназы и противоопухолевых антибиотиков доксорубина и блеомицина ограничивать скорость клеточной миграции в отношении линий клеток аденокарциномы двенадцатиперстной кишки человека Hutu 80 и Сасо-2. РНКза значительно снижала миграционную активность клеток во всем диапазоне исследуемых концентраций. Доксорубин и блеомицин не проявили значимого влияния на миграционную активность клеток карцином кишечника Hutu 80 и Сасо-2

6) Впервые определены параметры сочетанного действия биназы с противоопухолевыми антибиотиками доксорубином и блеомицином на миграционную активность клеток аденокарцином кишечника Hutu 80 и Сасо-2. В отношении клеток Hutu 80 в ряде комбинаций с низкими концентрациями биназы и доксорубина обнаружен синергизм препаратов. В комбинации с минимальными концентрациями биназы (10 мкг/мл) и блеомицина (10 мкг/мл) отмечен антагонизм агентов. Для клеток Сасо-2 после 48 ч воздействия биназы в сочетании с доксорубином большинство комбинаций показали антагонистическое действие и лишь в комбинации 10 мкг/мл биназы и 0.005 мкг/мл доксорубина зафиксирован синергизм. При сочетании биназы с блеомицином достоверный антагонизм в антимиграционном действии агентов обнаружен в вариантах с использованием 10 мкг/мл биназы. Зона синергии соответствовала сочетаниям с низкой концентрацией блеомицина (10 мкг/мл)