

На правах рукописи



Миронов Владислав Алексеевич

**АПОПТОЗ-МОДУЛИРУЮЩИЕ ЭФФЕКТЫ БИНАЗЫ В
ФАГОЦИТИРУЮЩИХ КЛЕТКАХ**

03.01.04 – Биохимия

Автореферат
диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Казань-2013

Работа выполнена на кафедре микробиологии Института фундаментальной
медицины и биологии Казанского федерального университета

Научные руководители: кандидат химических наук, старший научный
сотрудник Калачева Наталия Васильевна

доктор медицинских наук, профессор
Черепнев Георгий Валентинович

Официальные оппоненты: доктор медицинских наук, профессор
Мустафин Ильшат Ганиевич
(ГОУ ВПО «Казанский государственный
медицинский университет», г.Казань)

кандидат биологических наук, врач КЛД высшей
категории Саттарова Лилия Ирековна
(Межрегиональный клинико-диагностический
центр, г.Казань)

Ведущая организация: ФБУН «Казанский научно-исследовательский
Институт эпидемиологии и микробиологии»

Защита диссертации состоится «___» мая 2013 г. в 13 часов на заседании
диссертационного совета Д 212.081.08 при Казанском федеральном
университете по адресу: 420008, г. Казань, ул. Кремлевская, д. 18, главное
здание, ауд. 211.

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

Автореферат разослан «___» апреля 2013г.

Ученый секретарь
диссертационного совета,
доктор биологических наук



З. И. Абрамова

Актуальность проблемы. В течение последнего десятилетия регуляция
и медикаментозный контроль апоптоза становятся областью пристального

внимания биологов и клиницистов [*Caputo et al., 2012; Scatena, 2012; Sreedhar et al., 2004*]. Восстановление чувствительности клеток к индукции апоптоза имеет терапевтическое значение при неоплазиях, лимфопролиферации и аутоиммунных болезнях. Напротив, если ведущим компонентом патологического процесса является клеточная гибель (ишемия тканей, нейродегенерация, депрессия гемопоэза, ВИЧ-инфекция, ожоговая болезнь и др.), то патогенетически обосновано подавление апоптоза. Учитывая социальное значение апоптоз-зависимых заболеваний, поиск соединений с направленным воздействием на программированную клеточную гибель является актуальной проблемой современной медико-биологической науки [*Vasanth Raj et al., 2010; Penna et al., 2009; Chandrashekhar et al., 2001*].

В настоящей работе исследуются апоптоз-модулирующие эффекты биназы в фагоцитирующих клетках. Фагоцитирующие клетки крови – гетерогенная популяция, опосредующая антиинфекционную резистентность в рамках естественного иммунитета (гранулоциты) и адаптивного иммунитета (процессинг и представление антигенов моноцитами) [*Ярилин, 2010*]. Накоплено много данных об участии моноцитов и гранулоцитов в развитии соматических заболеваний, например, ишемической болезни сердца и атеросклероза, а также в формировании злокачественных новообразований [*Granot et al., 2011., Garlich et al., 2004; Libby et al., 2002*]. При этом в ряде работ отмечается положительная или отрицательная корреляция апоптотической гибели фагоцитирующих клеток с течением заболевания [*Нестеренко, 2010; Sica et al., 2007*]. Кроме того, фагоциты генерируют активные формы кислорода (АФК), и в случае нарушения своих функций становятся источником повреждения и гибели клеток [*Morel et al., 1991*]. В связи с этим работы по изучению соединений, способных модулировать апоптоз и функциональную активность фагоцитов, считаются одними из приоритетных в области медицинской биологии.

Поиск регуляторов апоптоза имеет предпочтительные шансы на успех в тех группах веществ, представители которых обладают широким спектром

биологических эффектов в различных тканях-мишенях. В этом аспекте заслуживают внимания рибонуклеазы. На сегодняшний день известен целый ряд эффектов этих ферментов (противовирусный, противоопухолевый, апоптогенный, иммуносупрессорный и другие), в связи с чем рибонуклеазы привлекают к себе внимание как потенциальные лекарственные средства нового поколения [*Fang et al., 2011; Ardelt et al., 2009; Makarov et al., 2008; Edelweiss et al., 2008; Ильинская и др., 2005; Spaletti-Cernia et al., 2004;*].

Объект настоящего исследования – РНКаза *Bacillus intermedius* (биназа). Выбор биназы для изучения потенциальной апоптоз-модулирующей активности в клетках крови не случаен. Он обусловлен тем, что биназа принадлежит к одному из наиболее хорошо изученных микробных ферментов и обладает способностью избирательно подавлять рост некоторых линий онкотрансформированных клеток, переводя их на путь апоптоза. Молекулярные механизмы селективного апоптогенного действия биназы на опухолевые клетки интенсивно изучаются [*Mitkevich et al., 2013; Кабрера Фуентес и др., 2010; Зеленихин и др., 2005*]. Кроме того, биназа обладает комплексом биологических эффектов на клеточном уровне, «триггерные» механизмы которых локализованы в мембране клеток. К ним относятся: индукция пролиферации, стимуляция дифференцировки Т-лимфоцитов, метаболическая активация нейтрофилов и др. [*Куриненко, 1991*]. Эти феномены не зависят от каталитической активности фермента. Несмотря на обилие экспериментальных работ, влияние биназы на апоптоз и функциональную активность фагоцитирующих клеток крови человека *ex vivo* не изучено.

Цель работы - анализ апоптоз-модулирующих эффектов биназы в фагоцитирующих клетках венозной крови человека и перитонеальных макрофагах крысы.

Задачи работы

1. Исследовать влияние биназы на развитие спонтанного и пероксид-индуцированного апоптоза в субпопуляциях лейкоцитов венозной крови человека.
2. Изучить действие биназы на апоптоз и некроз перитонеальных макрофагов крысы в условиях H_2O_2 -индуцированного окислительного стресса.
3. Оценить влияние биназы на интенсивность перекисного окисления липидов перитонеальных макрофагов крысы.
4. Охарактеризовать действие биназы на параметры основного фазового перехода дипальмитоилфосфатидилхолина (DPPC) гель-жидкий кристалл.
5. Исследовать влияние биназы на индукцию активных форм кислорода (АФК) и форболмиристатацетат (ФМА)-индуцированный апоптоз в моноцитах и гранулоцитах крови человека.
6. Сравнить проапоптогенные эффекты мономера и химически «сшитого» димера биназы.

Научная новизна. Впервые установлено, что биназа избирательно модифицирует спонтанный и пероксид-индуцированный апоптоз моноцитов крови человека и не влияет на запрограммированную клеточную гибель лимфоцитов и гранулоцитов. В условиях окислительного стресса биназа в зависимости от концентрации увеличивает жизнеспособность моноцитов и тормозит переход клеток из стадии раннего в стадию позднего апоптоза.

Впервые продемонстрировано, что биназа избирательно и дифференцированно действует на *E. coli*- и ФМА-зависимый окислительный взрыв в гранулоцитах и не влияет на эти процессы в моноцитах.

Выявлен синергизм действия биназы с форболмиристатацетатом в гранулоцитах и моноцитах крови человека в модели ФМА-индуцированного апоптоза.

Дальнейшая идентификация молекулярных механизмов цитопротекторного и апоптоз-модулирующего эффектов биназы в мононуклеарных фагоцитах позволит приблизиться к пониманию

избирательности действия биназы на клетки, в том числе и опухолевые, что в итоге будет способствовать разработке подходов к управлению программированной гибелью клеток.

Практическая значимость. Обнаруженные протекторный и апоптоз-модулирующий эффекты биназы в фагоцитирующих клетках открывают новые перспективы её применения и позволяют рассматривать биназу в качестве потенциального биофармацевтического модулятора апоптоза фагоцитов при воспалении, аутоиммунных заболеваниях и иммунодефицитах.

Полученный в работе химически «сшитый» димер биназы, сохраняющий до 50% удельной активности и обладающий более выраженным проапоптогенным действием на клетки по сравнению с мономером, представляет интерес как потенциальный противоопухолевый препарат.

Положения, выносимые на защиту

1. Биназа избирательно модулирует апоптоз и индукцию АФК в фагоцитирующих клетках периферической крови человека. Конечный эффект биназы зависит от субпопуляционной принадлежности клеток-мишеней, а также от природы используемых индукторов апоптоза и АФК.
2. Биназа проявляет протекторный и апоптоз-модулирующий эффекты в моноцитах человека в модели пероксид-индуцированного окислительного стресса.
3. Мембранотропность биназы - один из значимых факторов, определяющих механизмы ее цитопротекторного и апоптоз-модулирующего эффектов.

Апробация работы

Основные результаты диссертации были доложены на «First Interuniversity Conference on Modern Biology» (Казань, 2008), «XIV International Conference “Microbial Enzymes in Biotechnology and Medicine» (Казань, 2009), XIV Международной научной школе «Когерентная оптика и оптическая спектроскопия» (Казань, 2010), Международной научной конференции

студентов, аспирантов и молодых учёных «Ломоносов-2012» (Москва, 2012), Международной школе-конференции молодых ученых «Биология – наука XXI века» (Пушино, 2012), а также на итоговых конференциях КФУ (2010-2012).

Публикации

По теме диссертации опубликовано 8 научных работ, в том числе 4 статьи в рецензируемых журналах, рекомендованных ВАК.

Структура и объем диссертации

Диссертация состоит из введения, обзора литературы, описания методов исследования, изложения результатов и их обсуждения, заключения, выводов и списка цитируемой литературы. Работа изложена на 132 страницах текста и содержит 5 таблиц и 20 рисунков.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В работе использована гуанилспецифичная РНКаза *Bacillus intermedius* 7P дикого типа - биназа (КФ 3.1.27.3), катионный белок с молекулярной массой 12.3 кДа, состоит из 109 аминокислотных остатков [Aphanasenko et al., 1979]. Определена пространственная структура биназы [Reibarkh et al., 1998]. Электрофоретически гомогенный препарат биназы получали по методике, описанной в работе [Голубенко и др., 1979].

Лейкоциты выделяли из венозной крови здоровых доноров добровольцев, от которых было получено информированное согласие. Гепаринизированную венозную кровь отстаивали в течение 30 минут при 37°C, отбирали слой сыворотки с лейкоцитами и отмывали клетки центрифугированием (200 g, 10 мин). Полученный осадок лейкоцитов ресуспензировали в фосфатно-солевом буфере (рН 7,4) до конечной концентрации 10⁶ клеток/мл и раскапывали по 250 мкл в пробирки для проточной цитометрии (*Falcon 352054, BD*).

Работу с крысами проводили с соблюдением принципов Хельсинской декларации о гуманном отношении к животным. Белых беспородных крыс забивали декапитацией (с применением эфирного наркоза). Перитонеальные макрофаги выделяли из перитонеальных смывов, полученных путем введения

животным в брюшную полость холодного физиологического раствора. Клетки промывали 0,9% раствором NaCl, суспензировали в среде PRMI («Sigma», США), далее разводили до концентрации 10^6 клеток/мл и использовали в экспериментах в виде суспензии и монослойной культуры на покровных стеклах.

Индукцию апоптоза в клетках осуществляли в модели окислительного стресса, вызванного пероксидом водорода. Концентрацию пероксида водорода подбирали в зависимости от экспериментальной модели. Наряду с пероксидом водорода в качестве индуктора апоптоза использовали ФМА.

Цитометрический анализ субпопуляций лейкоцитов выполняли на проточном лазерном цитофлуориметре FACS Calibur (*Becton Dickinson, USA*), оснащенный двумя лазерами с длиной волны 488 нм и 635 нм.

Экспрессию фосфатидилсерина (ФС) и проницаемость плазматической мембраны на уровне отдельной клетки оценивали по модифицированному протоколу [*Laakko et al., 2002*]. В опытные пробы вносили раствор биназы в фосфатно-солевом буфере (конечная концентрация 400 и 40 мкг/мл), инкубировали 30 мин и добавляли пероксид водорода в конечной концентрации 3 мМ (или ФМА в конечной концентрации 10^{-7} М). В контрольные пробы вместо биназы, пероксида водорода (или ФМА) вносили фосфатно-солевой буфер в эквивалентном объеме. Клетки инкубировали 3 часа в CO₂-инкубаторе при 37 °С и 100% влажности. В пробы (опытные и контрольные) за 10 мин перед цитометрическим анализом вносили ФС-связывающий флуорохром мероцианин-540 (MC-540) в конечной концентрации 0,2 мкг/мл. Для оценки проницаемости плазматической мембраны в клеточную суспензию одновременно с MC-540 вносили TO-PRO-3-йодид в конечной концентрации 0,2 мМ. MC540 связывается с остатками фосфатидилсерина, экспонированного на мембране апоптозных клеток. ДНК-тропный флуорохром TO-PRO-3 через поврежденную цитоплазматическую мембрану проникает внутрь клетки и окрашивает ДНК. Лимфоидную, моноцитарную и

гранулоцитарную субпопуляции выделяли по показателям прямого (FSC, диаметр клетки) и бокового (SSC, гранулярность клетки) светорассеяния.

После исключения дэбриса и выделения лимфоидного, моноцитарного и гранулоцитарного регионов, подсчитывали долю: интактных клеток [фенотип MC540(-)TO-PRO-3(-)]; клеток на ранней стадии апоптоза [фенотип MC540(+)-TO-PRO-3(-)]; клеток на поздней стадии апоптоза [фенотип MC540(+)-TO-PRO-3(+)]; некротических клеток [фенотип MC540(-)TO-PRO-3(+)].

Генерацию АФК в моноцитах и гранулоцитах измеряли методом проточной цитометрии с использованием тест-набора Phagoburst[®] (*OPREGEN Pharma, Germany*) по инструкции производителя. Для индукции АФК применяли лиофильно высушенную опсонизированную культуру бактерий *E. coli* и форбол-12-миристан-13-ацетат. Внутриклеточную продукцию АФК регистрировали при окраске дигидрорадаминем 123 (DHR123).

В опытные пробы с клеточной суспензией вносили раствор биназы в фосфатно-солевом буфере (конечная концентрация 400 и 40 мкг/мл) и 20 мкл рабочего раствора DHR123. Под действием АФК DHR123 превращался в родамин 123 (Rh123), флуоресценцию которого регистрировали на проточном цитофлуориметре.

Идентификацию жизнеспособных, некротических и апоптотических макрофагов осуществляли методом световой микроскопии. Некротические и апоптотические клетки дифференцировали по характерным морфологическим признакам [*Debby et al., 2004*] после окрашивания по Романовскому-Гимза. Жизнеспособность клеток оценивали с помощью красителя трипанового синего. Анализировали несколько полей зрения на каждом стекле и рассчитывали относительное содержание каждой клеточной популяции.

Реакции перекисного окисления липидов (ПОЛ) регистрировали на программируемом биохемилюминиметре БХЛ-6 (Нижний Новгород, Россия) по стандартной методике [*Данилова, 2003*]. Измеряли следующие показатели:

светосумму (S) хемилюминесценции (ХЛ), интенсивность максимальной вспышки (I_{\max}) и тангенс угла падения кинетической кривой (tga).

Калориметрические измерения выполняли на микрокалориметре MicroCal VP-DSC Microcalorimeter (*Täby, Sweden*). Были исследованы температура и энтальпия основного фазового перехода DPPC гель-жидкий кристалл и кривые плавления липида в присутствии 100 и 200 мкг/мл биназы. Термограммы были получены при нагревании и охлаждении от 5 до 45°C. Обработку данных производили с помощью программного обеспечения *MicroCal Origin*.

Димер получали посредством «сшивания» молекул биназы диметилсуберимидатом [*Wang et al.*, 1976].

Визуализацию клеточной поверхности макрофагов проводили в открытой камере при комнатной температуре в полуконтактном режиме на атомном силовом микроскопе (АСМ) Solver P47H (ЗАО «НТ-МДТ»), сканер 50 мкм. Использовали кремниевые кантилеверы NSG11 (ЗАО «НТ-МДТ») с радиусом кривизны острия не менее 10 нм. Применялись 3 методики сканирования: постоянной амплитуды, фазового контраста и сигнала рассогласования. Рабочая амплитуда колебаний кантилевера 30—50 нм.

Статистическую обработку результатов проточно-цитометрического анализа выполняли методами непараметрической статистики (критерий Колмогорова-Смирнова и критерий χ^2 -квадрат с коррекцией Yates) в пакетах CellQuestPro и STATISTICA 7.0. На каждый вариант опыта просчитывали не менее 25000 клеточных событий. В работе представлены результаты, вычисленные суммированием четырёх независимых экспериментов.

Эксперименты с макрофагами проводили не менее четырёх раз и статистически обрабатывали с использованием стандартного пакета программ *Microsoft Excel 2007*. Уровень достоверности отличий рассчитывали по критерию Стьюдента. Стандартное отклонение не превышало 5 %.

АСМ изображения препаратов обрабатывали с помощью программного обеспечения *Nova 1.0.26.1138 RC* для зондовых микроскопов (ЗАО «НТ-МДТ»).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Предполагая наличие апоптоз-модулирующего эффекта биназы в клетках крови, мы основывались на результатах предыдущих исследований: биназа стимулирует функции различных клеток и клеточных систем: В- и Т-лимфоцитов, нейтрофилов, фракций клеток костного мозга, обогащённых стволовыми клетками, систем лизоцима и комплемента [Куриненко и др., 1995; Куриненко, 1991; Нехорошкова и др., 1988]. Принимая во внимание оригинальную концепцию связи иммунного ответа и апоптоза, предложенную Кромером и соавторами [Kroemer et al., 1997], нами было исследовано влияние биназы на апоптоз различных субпопуляций лейкоцитов крови человека.

Согласно результатам, полученным ранее [Калачева и др., 2005], биназа в концентрации до 100 мкг/мл стимулирует функциональную активность макрофагов, а в концентрации выше 100 мкг/мл ингибирует её. Тенденция сохраняется и в отношении других клеток, в том числе онкотрансформированных, для которых цитотоксичными являются высокие концентрации РНКаз [Кабрера Фуентес и др., 2005]. В связи с этим в работе мы сравнивали две концентрации биназы: до 100 мкг/мл (нетоксичная) и выше 100 мкг/мл (токсичная).

Избирательное действие биназы на спонтанный и пероксид-индуцированный апоптоз субпопуляций лейкоцитов крови человека

На рисунках 1, 2 и 3 суммированы результаты экспериментов по изучению влияния биназы на спонтанный и H₂O₂-индуцированный апоптоз моноцитов, лимфоцитов и гранулоцитов.

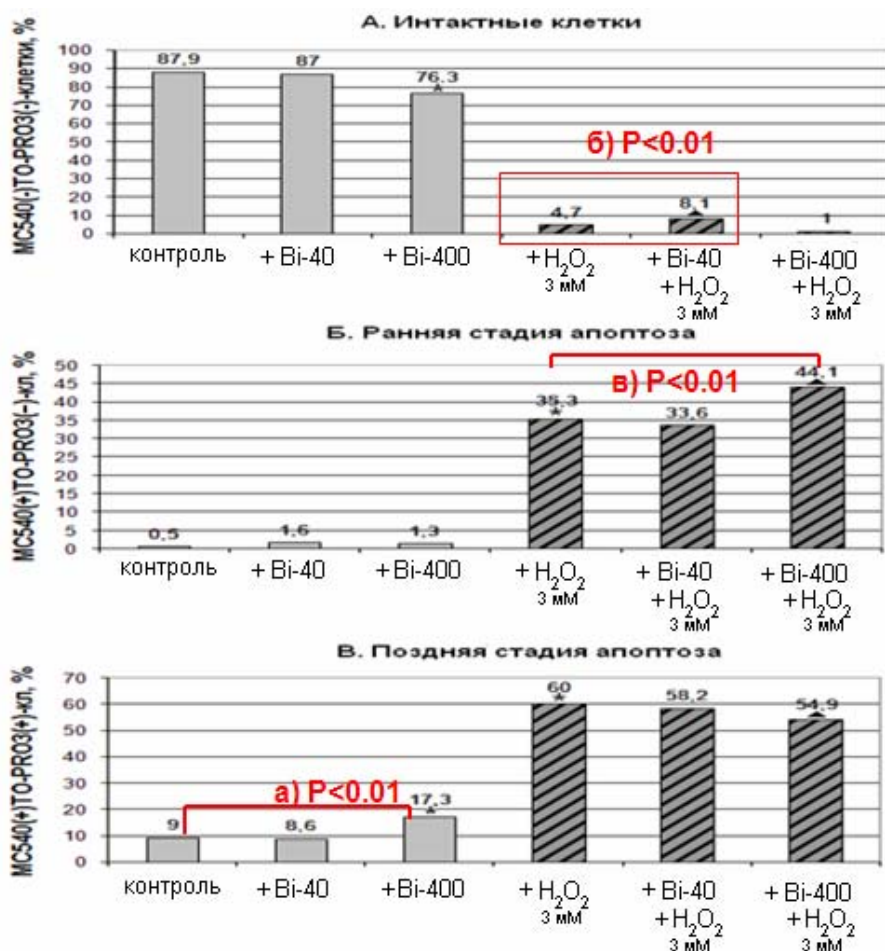


Рис.1. Влияние биназы на спонтанный и H₂O₂ - индуцированный апоптоз моноцитов.

* - P < 0.01 по сравнению с контролем (жизнеспособные клетки), ▲ - P < 0.01 по сравнению с клетками, обработанными H₂O₂.

а) Bi-400 увеличивает долю моноцитов в поздней стадии апоптоза на 92,2%; б) Bi-40 в модели окислительного стресса увеличивает долю интактных моноцитов на 72,3%; в) Bi-400 модифицирует динамику H₂O₂-индуцированного апоптоза моноцитов, на 24,9% увеличивая накопление клеток в стадии раннего апоптоза.

Биназа в концентрации 40 мкг/мл (Bi-40) не проявляет апоптогенного эффекта в моноцитах, гранулоцитах и лимфоцитах, в то время как биназа в концентрации 400 мкг/мл (Bi-400) избирательно активирует апоптоз моноцитов (рис. 1в) и не модифицирует программированную клеточную гибель гранулоцитов и лимфоцитов (Рис. 2, 3). Избирательное действие биназы на моноциты можно объяснить наличием у моноцитов «мишени» для биназы и отсутствием таковой у гранулоцитов и лимфоцитов.

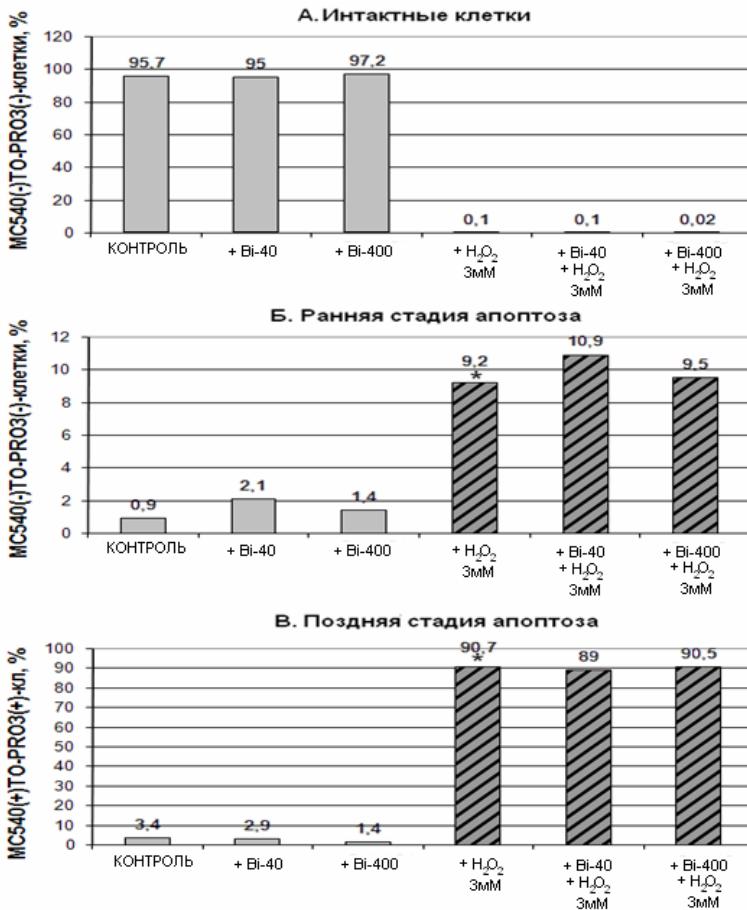
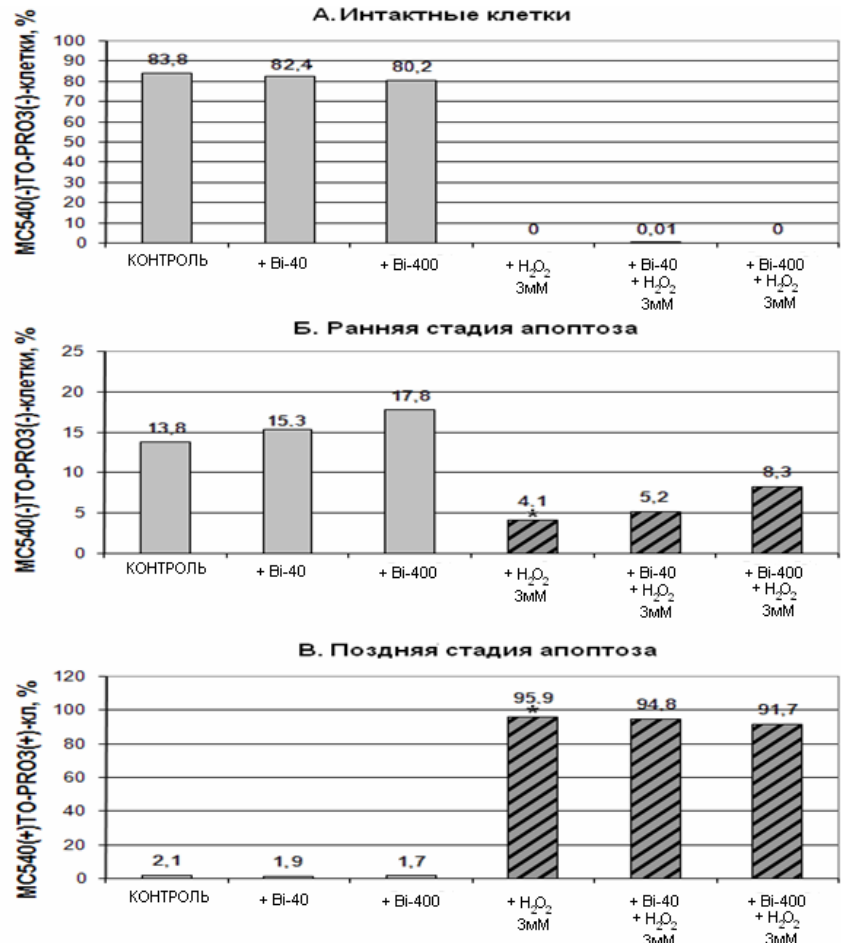


Рис. 2. Влияние биназы на спонтанный и пероксид-индуцированный апоптоз лимфоцитов.
* - P < 0.01 по сравнению с контролем (жизнеспособные клетки)

Рис. 3. Влияние биназы на спонтанный и пероксид-индуцированный апоптоз гранулоцитов.
* - P < 0.01 по сравнению с контролем (жизнеспособные клетки)



Примечательно, что в условиях окислительного стресса биназа также проявляет избирательность действия по отношению к моноцитам. Однако, эффект биназы отличается от такового, наблюдаемого при спонтанном апоптозе. Биназа не модифицирует H_2O_2 -индуцированный апоптоз гранулоцитов и лимфоцитов, но в то же время снижает проапоптогенный эффект пероксида водорода в отношении моноцитов. Протекторное действие биназы проявляется в увеличении доли жизнеспособных моноцитов при концентрации 40 мкг/мл и снижении доли клеток в фазе позднего апоптоза в результате замедления перехода моноцитов из фазы раннего в фазу позднего апоптоза при концентрации 400 мкг/мл (Рис.1).

Протекторный эффект биназы в перитонеальных макрофагах крысы

Наряду с клетками крови человека мы исследовали действие биназы на развитие пероксид-индуцированного апоптоза в перитонеальных макрофагах крысы. Моноциты являются предшественниками тканевых, в том числе перитонеальных макрофагов. Гистогенетически обе субпопуляции принадлежат к системе мононуклеарных фагоцитов. В условиях окислительного стресса инкубация макрофагов с биназой приводила к снижению гибели перитонеальных макрофагов от некроза, переводя их на доминирующий путь апоптоза (рис. 4). При концентрации 200 мкг/мл наблюдалась тенденция к увеличению доли жизнеспособных клеток.

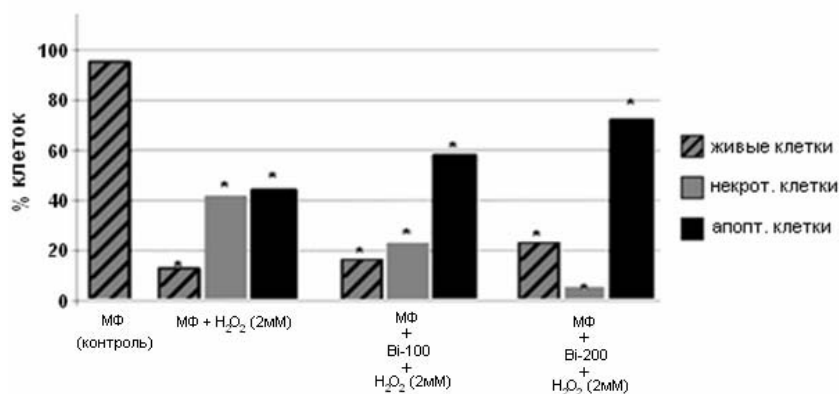


Рис. 4. Влияние биназы 100 мкг/мл (Bi-100) и 200 мкг/мл (Bi-200) на гибель макрофагов в условиях окислительного стресса, индуцированного 2 мМ H_2O_2 . Время инкубации макрофагов с H_2O_2 – 3 часа.

Сравнение протекторного эффекта биназы в перитонеальных фагоцитах крысы и моноцитах человека

Мы сопоставили эффекты биназы в моноцитах донорской крови с таковыми в перитонеальных макрофагах крысы (рис. 5). Из рисунка следует, что независимо от видовой принадлежности клеток-мишеней в условиях окислительного стресса биназа в концентрации 400 мкг/мл проявляет протекторный эффект, который выражается в увеличении количества жизнеспособных клеток у макрофагов крысы и торможении наступления позднего апоптоза в моноцитах человека.

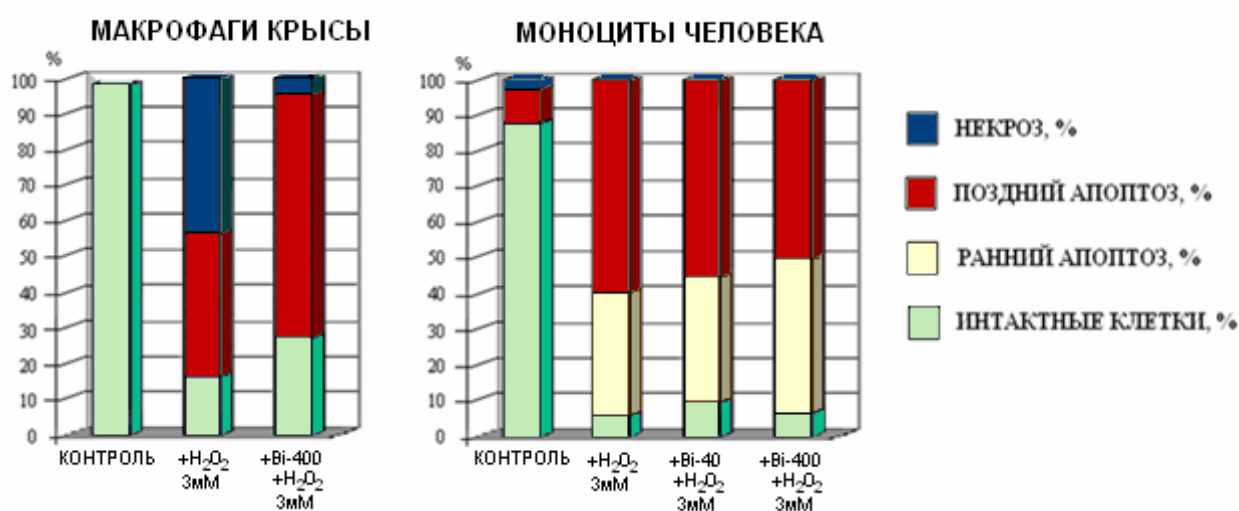


Рис 5. Сходство протекторного эффекта биназы в перитонеальных макрофагах крысы и моноцитах человека в условиях окислительного стресса.

Влияние биназы на свойства цитоплазматической мембраны

Клеточная мембрана – одна из самых чувствительных мишеней при действии на клетку многих факторов, в том числе повреждающих. Среди последних существенную роль играют АФК. К числу АФК относят пероксид водорода, который в силу своей способности в присутствии Fe^{2+} генерировать АФК, претендует на ведущую роль в реализации повреждающего действия на клетки.

Мы провели оценку интенсивности реакций ПОЛ в макрофагах при экспериментальном окислительном стрессе методом Fe^{2+} -индуцированной хемилюминесценции. Результаты экспериментов представлены на рис. 6. У макрофагов, предварительно проинкубированных с биназой, наблюдается

заметное снижение средних значений светосуммы и максимальной интенсивности хемилюминесценции по сравнению с контролем. Уменьшение этих показателей свидетельствует о значительном снижении интенсивности свободнорадикальных процессов в клетках, обработанных биназой, и затем подвергнутых окислительному стрессу. При этом тангенс угла наклона кинетической кривой хемилюминесценции (характеризует антиоксидантную активность системы) увеличивался. Полученные результаты, вероятнее всего, обусловлены изменением физико-химических характеристик мембраны макрофага после инкубации с биназой. В результате макрофаги становятся менее чувствительными к повреждающему действию пероксида водорода.

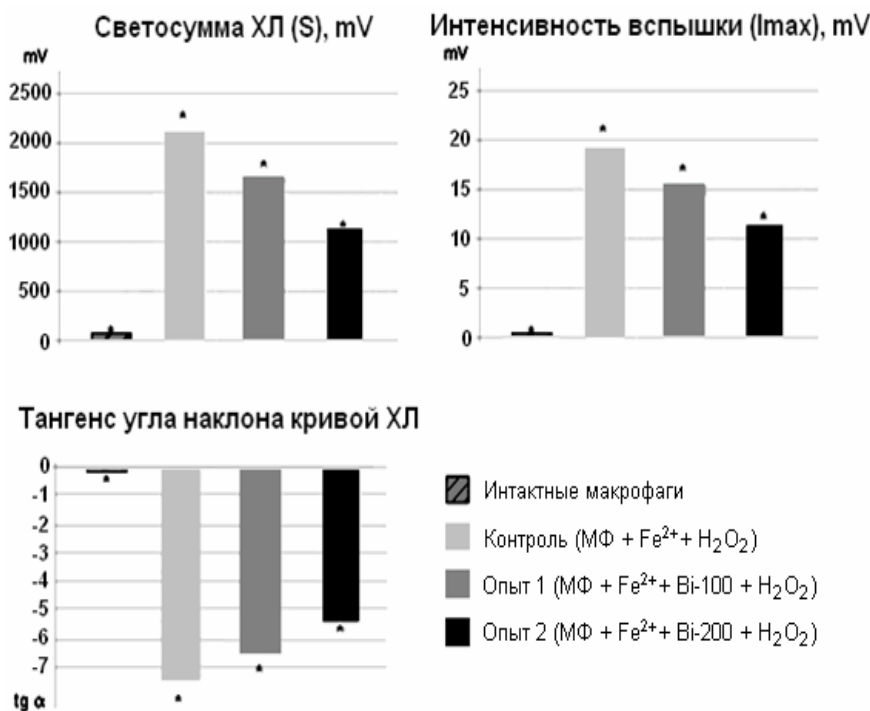


Рис. 6. Параметры Fe²⁺-индуцированной хемилюминесценции интактных макрофагов и макрофагов, инкубированных с биназой (30 мин), в условиях окислительного стресса, индуцированного H₂O₂ (20 мМ). (* P < 0.05)

О возможном изменении свойств мембраны после взаимодействия с биназой свидетельствуют результаты эксперимента, проведенного с везикулами DPPC с помощью метода дифференциальной сканирующей калориметрии (ДСК). Взаимодействие биназы с большими моноламеллярными везикулами DPPC сопровождается увеличением температуры фазового перехода липида гель – жидкий кристалл и уменьшением доли жидкой фазы при фазовом переходе (рис. 7, 8). Изменение этих параметров свидетельствует о стабилизирующем действии биназы на липид.

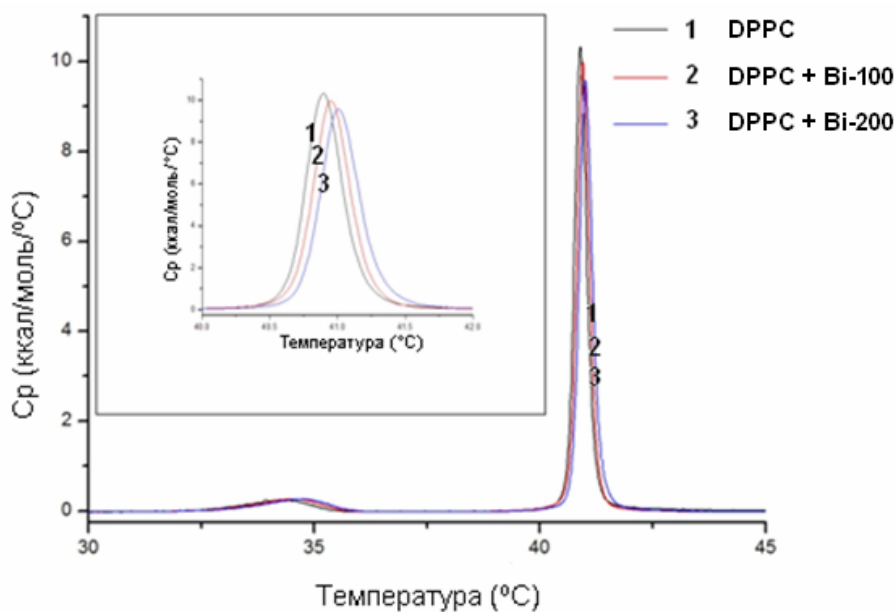
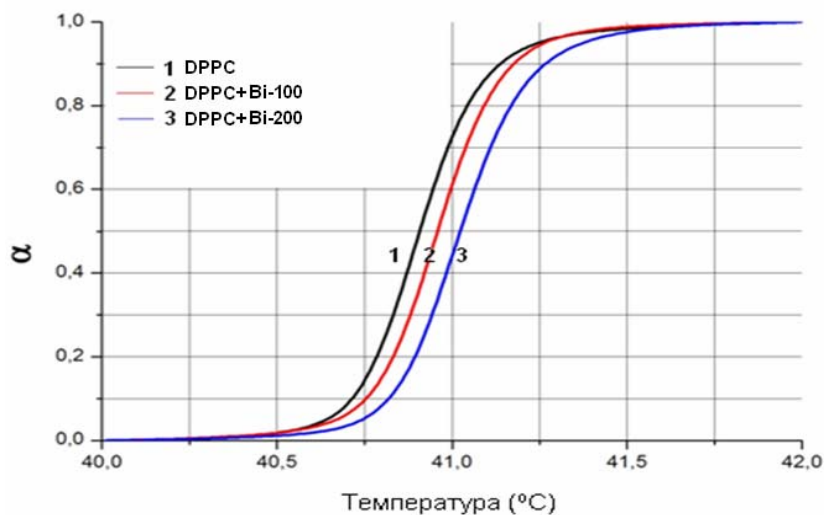


Рис. 7. Термограммы ДСК везикул DPPC в присутствии 100 и 200 мкг/мл биназы.

Рис. 8. Кривые плавления везикул DPPC. α – доля жидкой фазы при фазовом переходе.



Гипотетическая модель протекторного и апоптоз-модулирующего эффектов биназы

На основании наших оригинальных результатов и опубликованных данных мы предлагаем гипотетическую модель протекторного и апоптоз-модулирующего эффектов биназы в условиях окислительного стресса (Рис.9).

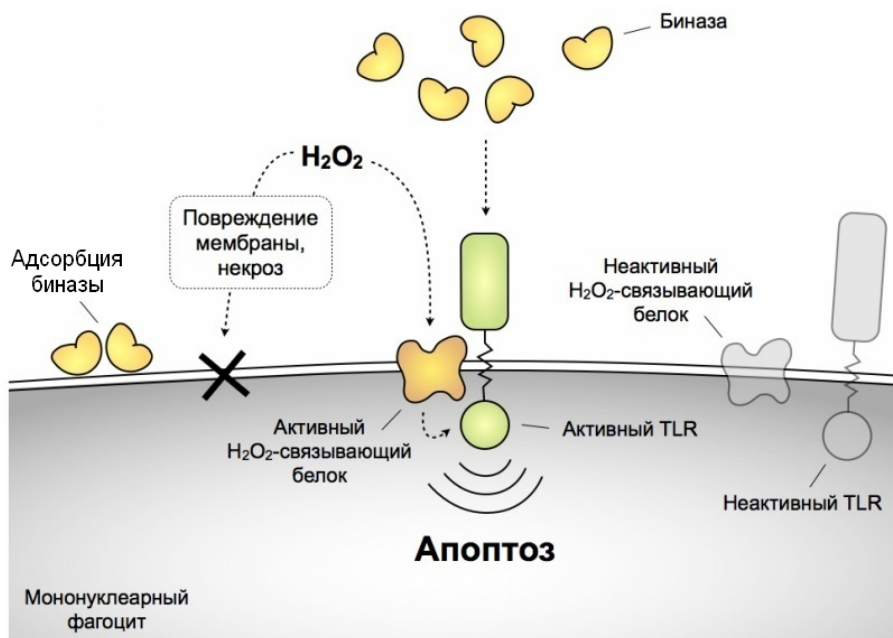


Рис. 9. Предполагаемые пути реализации протекторного и апоптоз-модулирующего эффектов биназы в мононуклеарных фагоцитах в условиях окислительного стресса (гипотетическая модель).

В макрофагах идентифицированы апоптоз-индуцирующие сигнальные пути, запускаемые пероксидом водорода [Ryan et al., 2004]. Вместе с тем, пероксид водорода способен оказывать цитотоксический эффект, проявляющийся в непосредственном повреждении мембраны и некротической гибели клетки [Трофимов и др., 2004]. Адсорбция РНКазы клеточной мембраной, вызывая структурные перестройки мембраны, стабилизирующие её бислой, ограничивает разрушающее действие на мембрану пероксида водорода. В результате некротическая гибель клеток снижается. Подобный механизм стабилизации мембран после взаимодействия клеток с биназой, вероятно, лежит в основе её антимуtagenной активности [Иванченко и др., 1995] и способности предотвращать гибель эритроцитов от осмотического шока [Кабрера-Фуентес и др., 2012].

Изменение свойств мембраны может отразиться на функционировании мембранных рецепторов. Результаты ряда исследований свидетельствуют о потенциальном участии TOLL-подобных рецепторов (TLR) в системе H_2O_2 -индуцированных NF- κ B-зависимых сигнальных путей, ведущих к аутофагии, некрозу и апоптозу [Bortoluci et al., 2010]. Экспериментально доказано, что пероксид водорода инициирует активацию NF- κ B и AP-1 в кардиомиоцитах посредством TLR-2-зависимого механизма [Frantz et al., 2001]. С другой стороны известно, что некоторые компоненты бактериальных клеток, в том

числе из рода *Bacillus*, взаимодействуют с макрофагами через TLR-2 и TLR-4 [Huang et al., 2008], а биназа концентрационно зависимо модулирует функциональную активность макрофагов [Калачева и др., 2005]. В связи с этим, логично предположить, что биназа способна активировать TLR макрофага и запускать через них апоптоз (рис.9). Предлагаемый механизм мог бы объяснить обнаруженный проапоптогенный ко-стимулирующий эффект комбинации биназа + H₂O₂ и избирательное действие биназы на апоптоз в моноцитах. Однако, предположение о TLR-зависимых механизмах действия биназы нуждается в экспериментальном подтверждении.

Влияние биназы на индукцию АФК в гранулоцитах и моноцитах человека

Мы исследовали действие биназы на *E. coli*- и ФМА-зависимый окислительный взрыв в гранулоцитах и моноцитах. Биназа избирательно и разнонаправленно действует на *E. coli*- и ФМА-зависимый окислительный взрыв в гранулоцитах и не влияет на эти процессы в моноцитах (табл. 1)

Таблица 1.
Влияние биназы на индукцию АФК в моноцитах и гранулоцитах

Образец	Моноциты		Гранулоциты	
	Доля АФК-генерирующих клеток, %	Геометрическое среднее генерации АФК/клетку, усл.ед.	Доля АФК-генерирующих клеток, %	Геометрическое среднее генерации АФК/клетку, усл.ед.
Клетки интактные	3,29	8,54	0,05	24,10
Клетки + Vi-40	2,87	8,03	0,16	31,10
Клетки + Vi-400	5,84	11,31	0,36	32,20
Клетки + <i>E.coli</i>	25,88 ^A	8,83	42,49 ^B	44,50 ^B
Клетки + Vi-40 + <i>E.coli</i>	25,62 ^A	8,72	51,43 ^{B,C}	46,10 ^{B,C}
Клетки + Vi-400 + <i>E.coli</i>	17,83 ^A	7,87	55,18 ^{B,C}	71,00 ^{B,C}
Клетки + ФМА	74,43 ^A	14,60 ^A	97,98 ^B	131,00 ^B
Клетки + Vi-40 + ФМА	68,78 ^A	14,61 ^A	98,05 ^B	151,20 ^B
Клетки + Vi-400 + ФМА	65,92 ^A	12,10 ^A	97,99 ^B	113,40 ^B

^A - P < 0.01 по сравнению с контролем (интактные моноциты)

^B - P < 0.001 по сравнению с контролем (интактные гранулоциты)

^C - P < 0.01 по сравнению с гранулоциты + *E. coli*

Механизм ответа гранулоцита зависит от природы используемого индуктора. Если опсонизированные *E. coli* активируют фагоциты через Fc-рецепторы, то действие ФМА опосредовано только протеинкиназой С (ПКС). Форболовые эфиры (в том числе ФМА) легко проникают в клетку и, имея структурное сходство с диацилглицерином, взаимодействуют с его участком связывания на молекуле протеинкиназы С [Nishizuka, 1984]. Далее активированная ПКС осуществляет фосфорилирование НАДФН-оксидазы, которая в свою очередь инициирует продукцию активных форм кислорода (респираторный взрыв). Таким образом, в гранулоцитах биназа модулирует генерацию АФК как на мембранном (индуктор *E. coli*), так и на внутриклеточном уровне (индуктор ФМА). При этом биназа, действуя на уровне цитоплазматической мембраны, стимулирует генерацию АФК. При использовании в качестве индуктора АФК форболмиристатацетата низкая (нетоксичная) концентрации биназы стимулирует функциональную активность фагоцитов, а высокая (токсичная) угнетает её. Стимулом дыхательного взрыва при ФМА-зависимом окислительном взрыве в фагоцитах служит активация ПКС. ПКС – кальций зависимый подмембранный фермент [Kishimoto et al., 1980]. На основании того факта, что биназа оказывает влияние на содержание ионов внутриклеточного кальция (Ca^{2+}) [Кабрера-Фуентес и др., 2012], можно предположить, что тенденция к разнонаправленному действию биназы на интенсивность ПКС-опосредованной продукции АФК на клетку обусловлена изменением внутриклеточного гомеостаза ионов кальция (Ca^{2+}).

Влияние биназы на ФМА-индуцированный апоптоз в гранулоцитах и моноцитах человека

Форболовые эфиры, в их числе ФМА, являются модуляторами активности ПКС, которая регулирует пролиферацию, дифференцировку и апоптоз ряда клеток [Рукша Т.Г., 2012; Gonzalez-Guerrico et al., 2005]. Учитывая, что в гранулоцитах биназа модулирует ПКС-опосредованную индукцию АФК, логично было предположить, что биназа может оказать

влияние на ФМА-индуцированный апоптоз в этих клетках. Действительно, в гранулоцитах биназа в нетоксической концентрации умеренно, а в токсической концентрации выразенно активирует ФМА-индуцированный апоптоз, обнаруживая синергизм с ФМА (рис.10). Механизм потенцирования биназой ФМА-индуцированного апоптоза, вероятнее всего, также может быть связан с изменением содержания внутриклеточного Ca^{2+} , поскольку синергизм между кальцием и ПКС имеет большое значение для ПКС-зависимых внутриклеточных процессов.

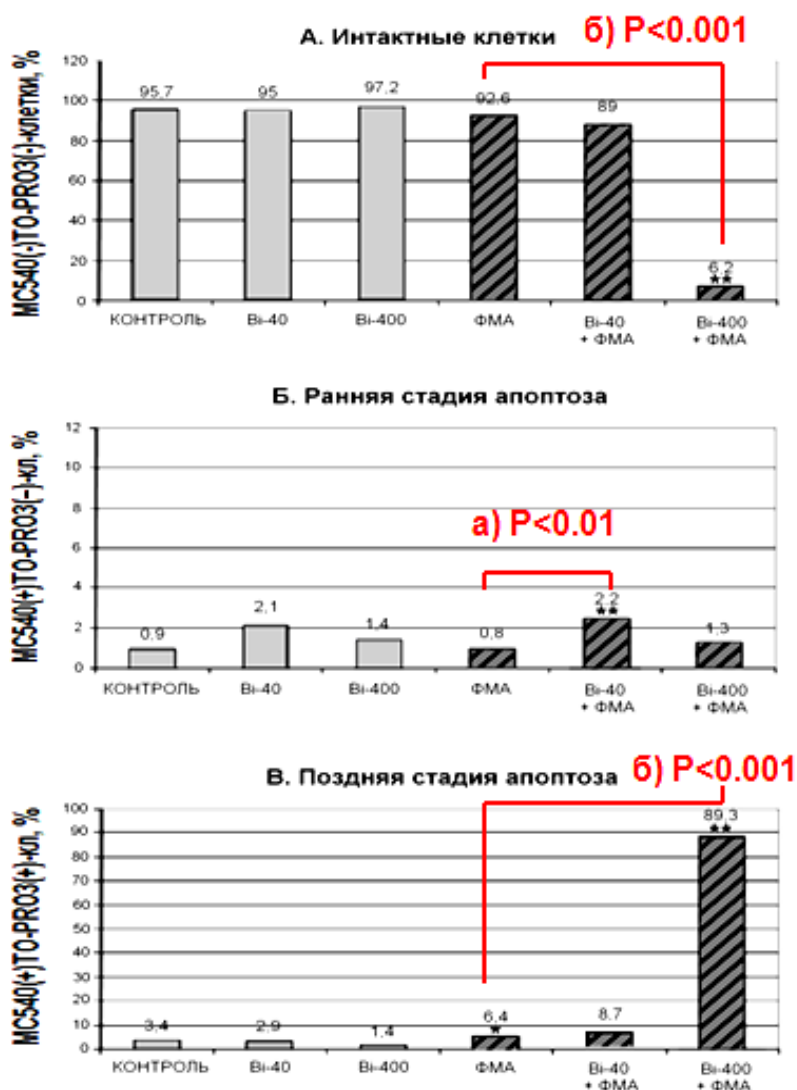


Рис. 10. Влияние биназы на ФМА-индуцированный апоптоз в гранулоцитах.

* P < 0,01 по сравнению с контролем;

** P < 0,001 по сравнению с ФМА.

а) Bi-40 умеренно стимулирует апоптогенный эффект ФМА.

б) Комбинация Bi-400 + ФМА вызывает драматическое увеличение доли гранулоцитов в фазе позднего апоптоза, при этом доля интактных клеток сокращается (92,6% против 6,2%).

При ФМА-индуцированном апоптозе в моноцитах биназа в концентрации 40 мкг/мл вызывает: а) двукратное увеличение доли моноцитов в раннем апоптозе и б) 1,5-кратное уменьшение доли клеток в стадии позднего апоптоза. В концентрации 400 мкг/мл биназа обнаруживает аддитивный синергизм с ФМА.

Таким образом, протекторный и апоптоз-модулирующий эффекты биназы наблюдаются в моноцитах при различных индукторах апоптоза (H_2O_2 и ФМА).

Идентичные эффекты биназы в моноцитах человека в условиях пероксид-индуцированного и ФМА-индуцированного апоптоза в очередной раз демонстрируют ее избирательную клеточную тропность и косвенно подтверждают мембрано-зависимый механизм взаимодействия биназы с моноцитом.

Проапоптогенный эффект мономера и димера биназы в перитонеальных макрофагах крысы

Нами получен димер биназы посредством ковалентного связывания её молекул диметилсуберимидатом. Димер сохранял до 50% удельной каталитической активности. Определение константы распределения мономерной и димерной форм РНКазы в двухфазной системе бутанол/вода показало, что у димерной формы биназы увеличена константа распределения по сравнению с мономером ($K_{распр}$ мономера = 0.46; $K_{распр}$ димера = 0.95). Это может свидетельствовать о большей стерической доступности неполярных областей в димере, а также косвенно указывает на увеличение его гидрофобности. Усиление гидрофобности, наряду с увеличением молекулярной массы, должно способствовать более эффективному связыванию димера с цитоплазматической мембраной и, как следствие, более выраженному изменению её свойств. АСМ-изображения клеточной поверхности макрофагов после их взаимодействия с мономерной и димерной форм биназы подтверждают это предположение (рис.11).

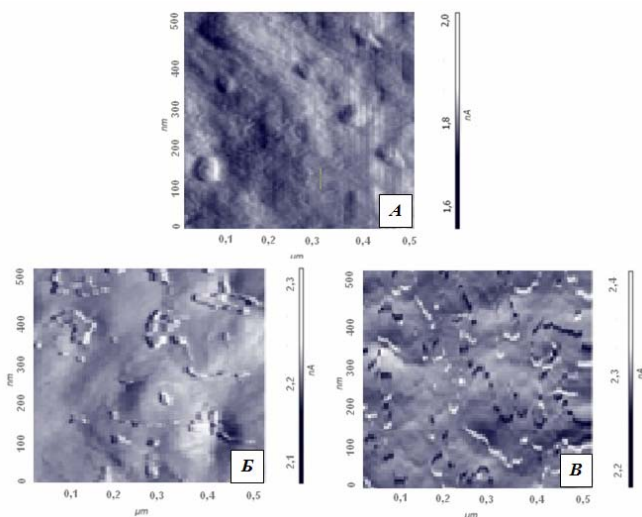


Рис. 11. АСМ-изображения клеточной поверхности макрофага, полученные в режиме сигнала рассогласования с помощью атомно-силового микроскопа: А – клеточная поверхность интактного макрофага; Б - клеточная поверхность макрофага, обработанная мономерной формой биназы (15 мкг/мл) в течение 10 мин; В - клеточная поверхность макрофага, обработанная димерной формой биназы (15 мкг/мл) в течение 10 мин. Размер кадра 0,5x0,5 мкм.

Изучение влияния мономера и димера биназы на апоптоз в монослойной культуре перитонеальных макрофагов крысы показало, что обе формы фермента обладают проапоптогенным эффектом. После 18 часов инкубации с мономером (400 мкг/мл) и димером (25 мкг/мл) большая часть клеток имели морфологические признаки, характерные для апоптоза. Доля апоптотически изменённых клеток, инкубированных как с мономером, так и с димером, увеличивалась в среднем в 7,5 раз по сравнению с контролем (интактные клетки). Но димер индуцировал апоптоз в концентрации в 15 раз меньшей концентрации мономера, что свидетельствует о его большей апоптогенной эффективности по сравнению с мономером.

ВЫВОДЫ

1. Биназа в токсичной концентрации избирательно активирует апоптоз моноцитов человека и не влияет на программированную клеточную гибель лимфоцитов и гранулоцитов. Апоптогенный эффект в моноцитах зависит от концентрации биназы.
2. В условиях окислительного стресса биназа в нетоксичной концентрации увеличивает субпопуляцию жизнеспособных моноцитов (цитопротекторный эффект), а в токсичной - меняет динамику H_2O_2 -индуцированного апоптоза, повышая долю моноцитов в стадии раннего апоптоза. Цитопротекторный и апоптоз-модулирующий эффекты биназы в моноцитах человека сохраняются в модели ФМА-индуцированного апоптоза.

3. В условиях окислительного стресса биназа препятствует гибели перитонеальных макрофагов по механизму некроза, переключая их на доминирующий путь апоптоза.
4. В присутствии биназы снижается интенсивность реакций перекисного окисления липидов в мембранах перитонеальных макрофагов крысы и изменяются параметры основного фазового перехода DPPC гель-жидкий кристалл. Взаимодействие биназы с большими моноламеллярными везикулами DPPC сопровождается увеличением температуры фазового перехода липида и уменьшением доли жидкой фазы при фазовом переходе.
5. Биназа избирательно и дифференцированно действует на *E. coli*- и ФМА-зависимый окислительный взрыв в гранулоцитах и не влияет на эти процессы в моноцитах.
6. В токсичной концентрации биназа обнаруживает синергизм с ФМА в моноцитах и гранулоцитах крови человека в модели ФМА-индуцированного апоптоза.
7. Химическая димеризация биназы сопровождается усилением её проапоптогенной активности в перитонеальных макрофагах крысы.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Согласно многочисленным публикациям особенностью биологической активности экзогенных РНКаз является избирательность их действия на клетки. Конечный результат при этом зависит как от типа клетки-мишени, так и от используемого фермента.

Мы показали, что действие биназы на гетерогенную популяцию фагоцитирующих клеток крови имеет селективный характер. Биназа проявляет цитопротекторный эффект и модулирует апоптоз в моноцитах, но не влияет на программированную гибель лимфоцитов и гранулоцитов. Наиболее значимым фактором, определяющим реализацию вышеперечисленных эффектов биназы, вероятнее всего, является её избирательная мембранотропность к моноклеарным фагоцитам.

Обнаруженные в исследовании протекторный и апоптоз-модулирующий эффекты биназы в моноцитах имеют важное значение для биохимии человека, в частности, для регуляции программированной клеточной гибели моноцитов при различных патологиях (атеросклероз, системные аутоиммунные заболевания и др.). Недавнее осознание того, что моноциты/макрофаги играют фундаментальную биологическую роль в репаративной регенерации тканей, тканевом гомеостазе и прогрессии рака требует осмысления механизмов, которые определяют продолжительность жизни моноцитов/макрофагов. В указанном контексте представляется целесообразным дальнейшее изучение биназы как перспективного терапевтического регулятора клеточной гибели.

ПУБЛИКАЦИИ

1. Миронов В.А. Влияние биназы на индукцию активных форм кислорода в гранулоцитах и моноцитах венозной крови человека / В.А. Миронов, Ф.В. Ширшиков, Н.В. Калачева, Г.В. Черепнев // **Фундаментальные исследования**. - 2012. - Т.11, ч.4. - С. 855-857. (перечень ВАК) - автора – 0,05 пл
2. Миронов В.А. Влияние биназы на некроз и апоптоз макрофагов в модели оксидативного стресса / В.А. Миронов, А.В. Филиппов, Ф.В. Ширшиков, Г.В. Черепнев, Н.В. Калачева // **Учен. зап. Казан. ун-та, Естеств. науки**. – 2012. - Т.154, кн.2. - С. 66-76. (перечень ВАК) - автора – 0,13 пл
3. Миронов В.А. Влияние биназы на форболмиристатацетат-индуцированный апоптоз в гранулоцитах и моноцитах венозной крови человека / В.А. Миронов, Ф.В. Ширшиков, Н.В. Калачева, Г.В. Черепнев // **Клеточная трансплантология и тканевая инженерия**. - 2012. - Т.7, №3. - С. 108-111. (перечень ВАК) - автора – 0,06 пл
4. Миронов В.А. Избирательное действие биназы на апоптоз субпопуляций лейкоцитов крови человека / В.А. Миронов, Ф.В. Ширшиков, Н.В. Калачева, Г.В. Черепнев // **Фундаментальные исследования**. - 2012. - Т.9, ч.1. - С. 53-59. (перечень ВАК) - автора – 0,1 пл

5. Гоенко И.А. Атомно-силовая микроскопия в исследовании морфологии поверхности перитонеальных макрофагов при апоптозе, вызванном рибонуклеазой *Bacillus intermedius* / И.А. Гоенко, О.А. Коновалова, **В.А. Миронов**, Н.В. Калачева // Сб.статей XIV Международной научной школы “Когерентная оптика и оптическая спектроскопия”. - 2010. - С.49-52. - автора – 0,06 пл
6. Миронов В.А. Влияние биназы на некроз и апоптоз макрофагов в условиях экспериментального оксидативного стресса / В.А. Миронов, Л.А. Борисова // Международная научная конференция студентов, аспирантов и молодых учёных «Ломоносов-2012». - 2012. - С. 173-174. - автора – 0,06 пл
7. Миронов В.А. Избирательное влияние биназы на апоптоз субпопуляций лейкоцитов крови человека / В.А. Миронов, Л.А. Борисова, Г.В. Черепнев, Н.В. Калачева // Международная школа-конференция молодых ученых «Биология – наука XXI века». - 2012. - С. 431. - автора – 0,02 пл
8. Kalacheva N.V. Investigation of action of monomeric and dimeric *Bacillus intermedius* RNase on cytoplasmic membrane of macrophage *in vitro* / N.V. Kalacheva, I.R. Efimova, **V.A. Mironov**, O.A. Konovalova, G.V. Cherepnev, B.M. Kurinenko // Abstracts XIV International Conference “Microbial Enzymes in Biotechnology and Medicine”. - 2009. - P. 86-87. - автора – 0,02 пл