

УДК 577.151:616.006.04

Противоопухолевое и антиметастатическое действие РНКазы А и ДНКазы I

О.А. Патутина¹, Н.Л. Миронова¹, Е.И. Рябчикова¹, Н.А. Попова², В.П. Николин²,
В.И. Каледин², В.В. Власов¹, М.А. Зенкова^{1,*}

¹Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, 630090,
Новосибирск, просп. ак. Лаврентьева, 8

²Институт цитологии и генетики СО РАН, 630090, Новосибирск, просп. ак. Лаврентьева, 11

*E-mail: marzen@niboch.nsc.ru

РЕФЕРАТ В данной работе на двух моделях метастазирующих опухолей мышей, карциноме легких Льюис и гепатоме А1 исследовано противоопухолевое и антиметастатическое действие РНКазы А и ДНКазы I. Обнаружено, что РНКаза А при внутримышечном введении в дозах 0.1–50 мкг/кг замедляет рост первичной опухоли на 20–40 %, а при повышении дозы до 0.5 мг/кг и выше эффект исчезает. Противоопухолевой активности ДНКаза I обнаружено не было. Внутримышечное введение РНКазы А (0.35–7 мкг/кг) или ДНКаза I (0.02–2.3 мг/кг) приводит к значительному снижению числа метастазов в легких у животных с карциномой легких Льюис и снижению печеночного индекса у животных с гепатомой А1. Гистологическое исследование органов показало, что введение РНКазы А или ДНКаза I приводит к патоморфозу метастазов, что выражается в разрушении опухолевых клеток, увеличении числа некрозов и апоптозов в очагах метастазирования, а также их инфильтрации лимфоцитами. Полученные данные показывают, что РНКаза А и ДНКаза I могут быть использованы в качестве терапии сопровождения при лечении метастазирующих форм опухолей.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА антиметастатическая активность, ДНКаза I, РНКаза А, карцинома легких Льюис, гепатома 1А.
СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ карцинома легких Льюис (LLC), гепатома 1А (HA-1).

ВВЕДЕНИЕ

Недавно полученные данные об участии малых некодирующих РНК в канцерогенезе [1–3] и опухолеспецифических ДНК в метастазировании («геном-генометастатическая гипотеза») [4] позволили по-новому взглянуть на ферменты, способные расщеплять нуклеиновые кислоты, как на возможные противоопухолевые и антиметастатические препараты.

В мире широким фронтом ведутся исследования противоопухолевого потенциала экзогенных рибонуклеаз. На сегодняшний день продемонстрирован высокий противоопухолевый потенциал BS-РНКазы [5–8] и онконазы [9–11], относящихся к семейству РНКазы А. Однако первые исследования противоопухолевой активности рибонуклеаз этого семейства были проведены именно с РНКазой А [12–14]. Полученные в этих экспериментах данные оказались противоречивыми. В ряде работ была продемонстрирована ее высокая противоопухолевая активность [12, 13], тогда как в других – полное отсутствие [14, 15]. Исследователи связывали отсутствие противоопухолевого действия РНКазы А с ее инактивацией под действием рибонуклеазного ингибитора [16, 17], взаимодействием с которым способны избегать онконазы и BS-РНКаза и за счет этого оказывать цитотоксическое действие на опухолевые клетки [18–20]. Антиметастатический потенциал ДНКаза I был продемон-

стрирован *in vivo* на модели опухоли L5178Y-ML, метастазирующей в печень [21, 22]. Однако использование ДНКаза I в качестве агента адъювантной терапии при лечении рака не получило распространения.

В данной работе на двух моделях опухолей мышей – карциноме легких Льюис (LLC), метастазирующей в легкие, и гепатоме 1А (HA-1), метастазирующей в печень, мы исследовали противоопухолевое и антиметастатическое действие ферментов РНКазы А и ДНКаза I. Оказалось, что внутримышечное введение РНКазы А в диапазоне доз 0.1–50 мкг/кг приводит к замедлению роста опухоли на 20–40 %. Введение РНКазы А или ДНКаза I приводит к двух-трехкратному снижению количества метастазов в легких (в случае LLC) и снижению печеночного индекса (в случае HA-1). Проведенный гистологический анализ показал, что введение ферментов приводит к разрушению опухолевых клеток, увеличению числа некрозов и апоптозов в очагах метастазирования и их инфильтрации лимфоцитами.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В работе использовали РНКазу А (13700 г/М) и ДНКазу I (2.155 КУ/мг) производства Sigma (USA); [γ -³²P]аденозин-5'-трифосфат ([γ -³²P]АТФ) (3000 Ки/ммоль) производства компании «Биосан» (Россия), Т4 полинуклеотидкиназу

фирмы Fermentas (Литва). Плазмида pHIV-2 была любезно предоставлена профессором Г.Дж. Гроссом (University of Wuerzburg, Wuerzburg, Germany).

Опухолевые штаммы LLC и HA-1 были получены из виария Института цитологии и генетики СО РАН, Новосибирск, Россия.

Введение радиоактивной метки по 5'-концу фрагмента РНК HIV-1, полученного с помощью транскрипции *in vitro*, проводили с помощью γ - ^{32}P АТФ и T4 полинуклеотидкиназы [23].

Определение ферментативной активности РНКазы А. Реакционную смесь объемом 10 мкл, содержащую 50 000 срп 5'- ^{32}P -меченной РНК, 10^{-10} – 10^{-7} М РНКазы А, 50 мМ Tris – HCl, pH 7.0, 200 мМ KCl, 1 мМ EDTA и 100 мкг/мл РНК-носителя, инкубировали при 37 °С в течение 1–15 мин. После окончания инкубации реакционные смеси экстрагировали фенолом, и РНК из водной фазы осаждали 96 %-ным этанолом. Продукты расщепления РНК анализировали с помощью электрофореза в 12 %-ном денатурирующем полиакриламидном геле.

Определение ферментативной активности ДНКазы I. Реакционную смесь объемом 10 мкл, содержащую 0.2 мкг плазмидной ДНК pHIV-2, 0.01–1 ед. акт. ДНКазы I, 10 мМ Tris – HCl, pH 7.5, 2.5 мМ MgCl_2 и 0.1 мМ CaCl_2 , инкубировали при 37 °С в течение 1–15 мин. Реакцию останавливали нагреванием реакционной смеси при 60 °С в течение 10 мин. Продукты расщепления ДНК анализировали электрофорезом в 1 %-ном агарозном геле.

Опухолевые модели. Самок мышей C57Bl/6 (возрастом 10–11 недель) и самок мышей A/Sn (возрастом 12–14 недель) содержали группами по 8–10 особей в пластиковых клетках в условиях нормального освещения. Животные имели свободный доступ к воде и пище. Все процедуры с животными проводили в соответствии с одобренными методиками и рекомендациями для обращения с лабораторными животными [European Communities Council Directive 86/609/CEE].

Для развития опухолей LLC или HA-1 в солидной форме опухолевые клетки LLC или HA-1 (10^6 кл./животное) внутримышечно прививали мышам C57Bl/6J или A/Sn, соответственно, в бедренную мышцу.

Исследование влияния внутримышечного введения РНКазы А и ДНКазы I на первичную опухоль и метастазы. На 4-й или 8-й день после имплантации клеток опухоли LLC мышам C57Bl/6J животных делили на группы и проводили ежедневные внутримышечные инъекции: группе 1 (контроль) – физиологического раствора, группам 2–9 – РНКазы А в физиологическом растворе (0.1 мл) в дозах 0.1, 0.5, 1, 10, 50 мкг/кг и 0.5, 1 и 10 мг/кг, соответственно; группам 10–13 – ДНКазы I в физиологическом растворе (0.1 мл) в дозах 0.02, 0.23, 1.15 и 2.3 мг/кг, соответственно.

В случае HA-1 на 8-й день после имплантации клеток опухоли HA-1 мышам линии A/Sn животных делили на группы и проводили внутримышечные инъекции: группе 1 (контроль) – физиологического раствора, группам 2–4 – РНКазы А в физиологическом растворе (0.1 мл) в дозах 0.35, 0.7 и 7 мкг/кг, соответственно; группам 5–9 – ДНКазы I в физиологическом растворе (0.1 мл) в дозах 0.02, 0.23, 1.15 и 2.3 мг/кг, соответственно.

В течение эксперимента животные получали 8–10 инъекций растворов ферментов или физиологического раство-

ра. Размер опухолей измеряли с помощью штангенциркуля каждые три дня, и объем опухолей рассчитывали по формуле: $V = (\pi/6 \times \text{длина} \times \text{ширина} \times \text{высота})$ [24].

На 20-й день после имплантации опухолей животных подвергали эвтаназии путем дислокации шейных позвонков. Печень мышей A/Sn с HA-1 взвешивали и определяли печеночный индекс (НИ) по формуле $\text{НИ} = (\text{вес печени} / \text{вес мышцы}) \times 100 \%$. Средний прирост веса печени (ALI) за время развития опухоли считали как разницу между средним значением НИ в экспериментальной группе и НИ здоровых животных, который равен 4.5 % для мышей A/Sn. Эффективность лечения (ТЕ) считали по формуле $\text{ТЕ} (\%) = 100 - \text{ALI}_{\text{эксп}} / \text{ALI}_{\text{контроль}} \times 100 \%$.

Легкие животных с LLC и печень животных с HA-1 фиксировали в 4 %-ном параформальдегиде для дальнейшего гистологического анализа. Количество метастазов в легких животных с LLC подсчитывали под бинокуляром.

Гистологический анализ. Фиксированные легкие и печень обрабатывали обычным способом и заливали в парафиновые блоки. Гистологические срезы (толщиной 5 мкм) получали с помощью микротомы и окрашивали гематоксилином и эозином. Патоморфологическое исследование препаратов проводили с помощью визуализации под микроскопом Axioimager Z (ZEISS).

Статистический анализ. В случае когда данные отвечали условиям нормальности, статистическую обработку выполняли, используя критерий Стьюдента. В иных случаях статистическую обработку результатов проводили с помощью непараметрического анализа, используя критерий Манна-Уитни. Различия считали достоверными при $p < 0.05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Выбор диапазона доз РНКазы А и ДНКазы I для экспериментов *in vivo*.

Поскольку предполагалось, что ферментативная активность РНКазы А и ДНКазы I важны для проявления ими противоопухолевого действия, в экспериментах *in vitro* были определены концентрации ферментов, при которых достигается 50 %-ное расщепление субстрата за относительно короткое время.

Для этого ^{32}P -РНК (10^{-5} М) инкубировали в присутствии 10^{-10} – 10^{-7} М РНКазы А при 37 °С в течение 1–15 мин. Анализ кинетики расщепления РНК показал, что 50 %-ное расщепление субстрата достигается при концентрации РНКазы А 10^{-9} М за 10 мин. Аналогично было найдено, что 50 %-ное расщепление ДНК-субстрата достигается при концентрации ДНКазы I 10 ед. акт./мл за 1 мин. Эти концентрации РНКазы А и ДНКазы I были взяты в качестве исходных для выбора диапазона доз ферментов в экспериментах *in vivo*.

ВЛИЯНИЕ РНКАЗЫ А И ДНКАЗЫ I НА РОСТ ПЕРВИЧНОЙ ОПУХОЛИ

Внутримышечное введение РНКазы А мышам C57Bl/6J с LLC. Способность РНКазы А влиять на рост первичной опухоли была исследована в экспериментах на мышах C57Bl/6J с LLC. На 4-й день после трансплантации опухоли животные получали ежедневные внутримышечные инъекции физиологического раствора (контроль) или рас-

твора РНКазы А в диапазоне доз от 0.1 мкг до 10 мг на кг веса животного (эксперимент).

На рис. 1А представлено изменение размеров опухолей в течение эксперимента в зависимости от дозы РНКазы А. Как видно из представленных данных, в группах животных с LLC, получавших лечение РНКазой А в дозах 0.5–50 мкг/кг, наблюдается замедление роста опухолей. На 8-й день после трансплантации LLC объем опухоли в этих группах мышей был на 20–40 % меньше, чем в контроле. К 11-му дню объем опухолей в тех же группах был меньше на 23–33 %, а к 13-му дню – на 16 % меньше, чем размер опухолей в контроле. В группах животных, получавших лечение РНКазой А в дозах свыше 0.5 мг/кг, ингибирования роста опухоли не наблюдалось (рис. 1А).

Внутримышечное введение РНКазы А мышам А/Sn с НА-1. Для того чтобы проверить, что противоопухолевая активность РНКазы А не является специфичной для конкретного типа опухоли, была исследована противоопухолевая активность этого фермента и на другой модели опухоли, гепатоме А1, на мышах А/Sn. Поскольку на модели LLC заметная активность РНКазы А наблюдалась в диапазоне доз 0.5–50 мкг/кг, в эксперименте с НА-1 также был использован этот диапазон доз. В этих экспериментах мыши С57В1/6J с LLC были использованы в качестве положительного контроля. Начиная с 8-го дня после имплантации опухолей, когда опухоли уже начинали пальпироваться, мыши с НА-1 или с LLC получали внутримышечные инъекции физиологического раствора или раствора РНКазы А в дозах 0.35, 0.7 и 7 мкг/кг.

Сравнение размера опухоли в контрольной группе и группах животных с LLC или НА-1, получавших лечение РНКазой А, показало, что в начальный период лечения (на 10-й день после трансплантации опухоли) размеры опухолей между группами различаются незначительно (рис. 1Б, 1В). К 15-му дню в группах животных с НА-1, получавших лечение РНКазой А в дозах 0.35 и 0.7 мкг/кг, размер опухоли был на 23 % меньше, чем в контроле (рис. 1В), а в группах животных с LLC – на 43 % меньше, чем в контроле (рис. 1Б). Следует отметить, что противоопухолевый эффект РНКазы А на модели LLC не зависел от того, на какой день (4-й или 8-й) после имплантации опухоли начиналось лечение. **Внутримышечное введение ДНКазы I мышам С57В1/6J с LLC и мышам А/Sn с НА-1.** Противоопухолевый потенциал ДНКазы I был исследован на двух моделях опухолей LLC и НА-1. Начиная с 8-го дня после трансплантации опухолей мышам С57В1/6J с LLC и мышам А/Sn с НА-1 внутримышечно вводили ДНКазу I в диапазоне доз 0.02–2.3 мг/кг. Измерение размера опухоли показало, что введение ДНКазы I не вызывает снижения скорости роста первичной опухоли.

ВЛИЯНИЕ РНКАЗЫ А И ДНКАЗЫ I НА РАЗВИТИЕ МЕТАСТАЗОВ

Антиметастатическую активность РНКазы А и ДНКазы I (способность снижать число метастазов в органах-мишенях) оценивали, (1) определяя количество метастазов в легких животных с LLC с помощью бинокля; (2) оценивая изменение веса печени (печеночный индекс) у животных с НА-1; (3) с помощью гистологического анализа органов-мишеней (легких в случае LLC и печени в случае НА-1).

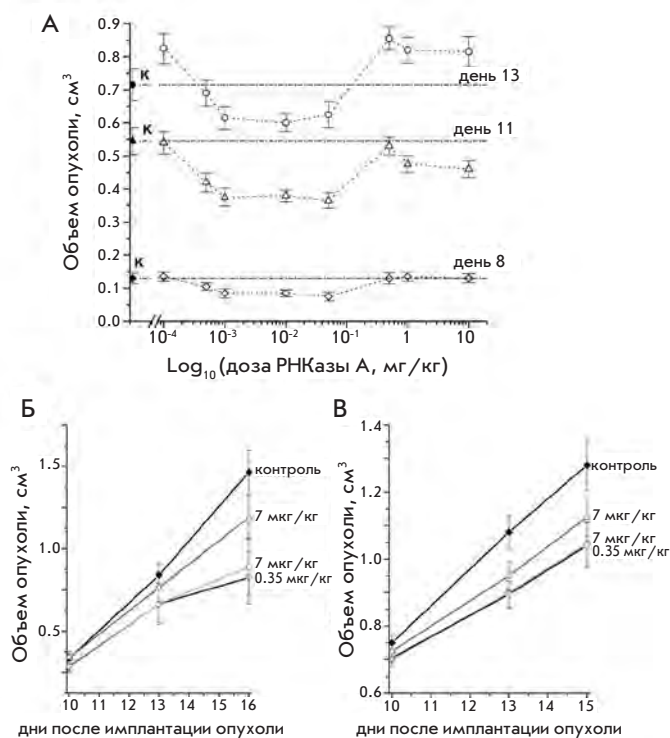


Рис. 1. Противоопухолевая активность РНКазы А. А. Влияние РНКазы А на рост первичной опухоли LLC у мышей С57В1/6J (концентрационная зависимость). В. Влияние РНКазы А в дозах 0.35, 0.7 и 7 мкг/кг на скорость роста первичной опухоли LLC у мышей С57В1/6J. С. Влияние РНКазы А в дозах 0.35, 0.7 и 7 мкг/кг на скорость роста первичной опухоли НА-1 у мышей А/Sn

ГИСТОЛОГИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ МЕТАСТАЗОВ В ЛЕГКИХ ЖИВОТНЫХ С LLC И ПЕЧЕНИ ЖИВОТНЫХ С НА-1

Образование метастазов в легочной ткани является отличительной чертой LLC. В легких контрольных мышей были обнаружены отчетливые метастазы и множественные группы опухолевых клеток (рис. 2А1, 2А2). Метастазы локализовались преимущественно в субплевральной области и имели разный размер и неправильную форму. В больших метастазах, охватывавших несколько бронхов и крупных сосудов, наблюдались признаки мононуклеарной инфильтрации (рис. 2А1). Поверхностные метастазы состояли из двух-трех слоев опухолевых клеток, расположенных вдоль плевры.

Развитие массивных метастазов в печени является отличительной чертой прогрессии НА-1. На гистологических срезах печеночной ткани выявлено множество метастазов различного размера (рис. 2А3). Было отмечено несколько морфологических типов метастазов: (1) метастазы с отчетливой внешней границей, имеющие псевдогранулярную структуру, состоящую в центре из светлых, плотно расположенных клеток, а по периферии – из базофильных клеток; (2) свободные скопления базофильных опухолевых клеток под печеночной капсулой; (3) небольшие клеточные объединения, состоящие из темных базофильных опухолевых клеток. В печеночной ткани мышей с НА-1 наблюдались многочисленные митозы в метастазах, одиночные

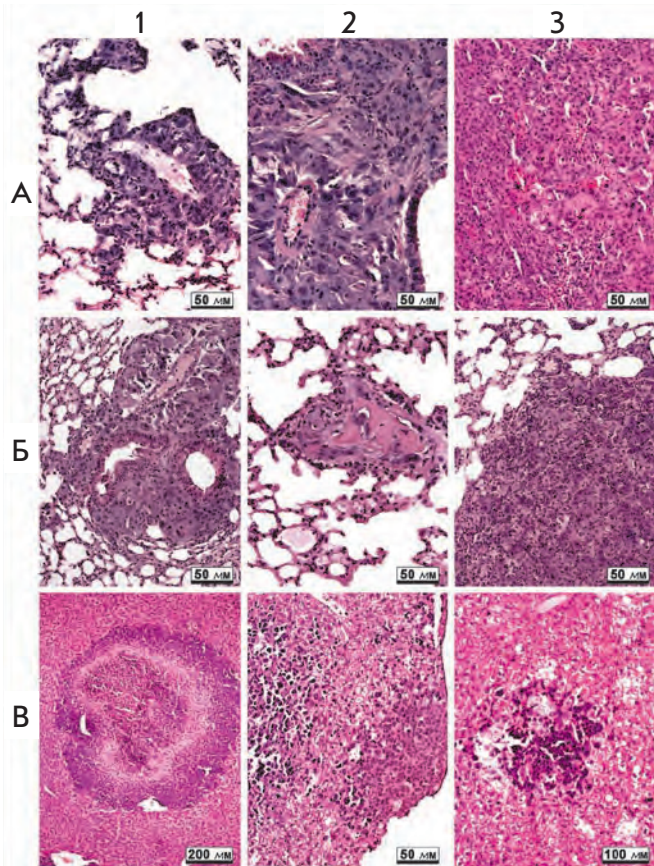


Рис. 2. А. Метастазы в легких животных с LLC (A1 и A2) и печени животных с HA-1 (A3). В. Метастазы в легких животных с LLC после лечения ДНКазой I (0.12 мг/кг) (B1) и РНКазой А (0.7 мкг/кг) (B2 и B3). С. Метастазы в печени животных с HA-1 после лечения ДНКазой I (0.02 мг/кг) (C1), ДНКазой I (1.2 мг/кг) (C2) и РНКазой А (0.35 мкг/кг) (C3)

рассеянные опухолевые клетки, лимфоцитарная инфильтрация печеночной паренхимы, дистрофические изменения и некрозы гепатоцитов (рис. 2А3).

ГИСТОЛОГИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ МЕТАСТАЗОВ В ЛЕГКИХ ЖИВОТНЫХ С LLC И ПЕЧЕНИ ЖИВОТНЫХ С НА-1, ПОЛУЧАВШИХ ЛЕЧЕНИЕ ФЕРМЕНТАМИ

Введение РНКазы А и ДНКазы I животным с LLC индуцировало появление дистрофических изменений в метастазах легких (рис. 2Б). Морфологические параметры этих изменений были идентичны для всех групп независимо от дозы: увеличение количества некрозов и апоптозов, дистрофические изменения онкоцитов, значительная мононуклеарная инфильтрация опухолевых экстравазатов и метастазов (рис. 2Б1–3).

Гистологическое исследование метастазов в печеночной ткани у мышей с НА-1 после лечения РНКазой А и ДНКазой I в различных дозах выявило отчетливые морфологические изменения, которые имели идентичные признаки. В метастатических очагах наблюдалось формирование центральных и перифокальных некрозов, отеки ткани,

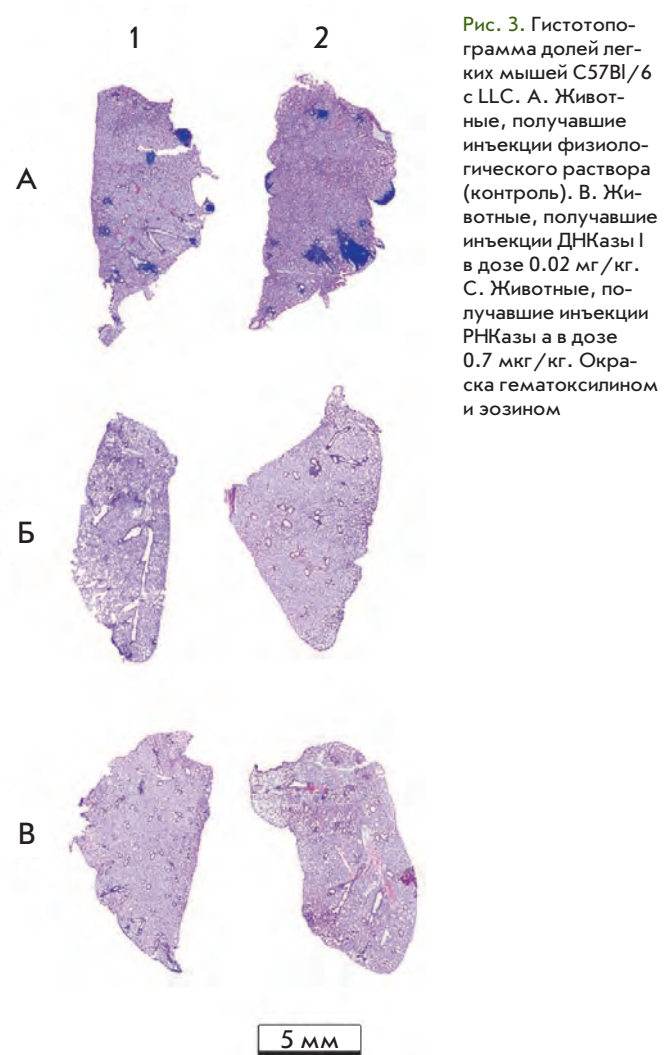


Рис. 3. Гистотопограмма долей легких мышей С57В1/6 с LLC. А. Животные, получавшие инъекции физиологического раствора (контроль). В. Животные, получавшие инъекции ДНКазы I в дозе 0.02 мг/кг. С. Животные, получавшие инъекции РНКазы а в дозе 0.7 мкг/кг. Окраска гематоксилином и эозином

множественные кровоизлияния и отчетливая мононуклеарная инфильтрация (рис. 2В1–3). Следует отметить, что у мышей с НА-1, получавших лечение ферментами, метастазы не были выявлены в миокарде и почках, тогда как у контрольных животных в этих органах были выявлены опухолевые инфильтраты.

Обращает на себя внимание состояние органов иммунной системы у животных с НА-1. В частности, в вилочковой железе прослеживались признаки акцидентальной инволюции, проявляющейся или повышением количества лимфоцитов в мозговом слое, или даже инверсией слоев тимуса. Аналогичные изменения, свидетельствующие о выраженной антигенной стимуляции, были обнаружены в ткани селезенки. Степень выраженности признаков антигенной стимуляции коррелировала с дозой фермента.

Таким образом, при сравнении групп контрольных животных с LLC или НА-1 и групп животных с опухолями, получавших лечение РНКазой А и ДНКазой I, выявлены признаки индуцированного патоморфоза метастазов, проявляющиеся в выраженных дистрофических изменениях опухолевых клеток и усилении мононуклеарной инфильтрации.

Таблица 1. Печеночный индекс (НИ), средний прирост веса печени (АЛІ) и терапевтическая эффективность (ТЕ) в группах мышей А/Sn с НА-1

	Контроль	Здоровые мыши	РНКаза А, мкг/кг			ДНКазы I, мг/кг			
			0.35	0.7	7	0.02	0.23	0.12	2.3
¹ НИ, %	6.7 ± 0.3	4.5	5.9 ± 0.2	6.0 ± 0.2	5.9 ± 0.2	5.5 ± 0.3	5.8 ± 0.2	5.6 ± 0.3	5.7 ± 0.2
² АЛІ, %	2.2	–	1.3	1.5	1.4	1.0	1.3	1.1	1.2
³ ТЕ, %	0	–	42	30	38	53	40	52	46

¹ НИ = (вес печени / вес мыши) × 100 %;

² АЛІ (%) = $\frac{НИ_{эксперимент} - НИ_{здоровых\ животных}}{НИ_{эксперимент}}$ × 100.

³ ТЕ (%) = $100 - \frac{АЛІ_{эксперимент}}{АЛІ_{контроль}} \times 100$.

ОПРЕДЕЛЕНИЕ ЧИСЛА МЕТАСТАЗОВ В ЛЕГКИХ ЖИВОТНЫХ С LLC ПОСЛЕ ЛЕЧЕНИЯ ФЕРМЕНТАМИ

Микроскопическое исследование метастазов на поверхности легких животных с LLC показало, что лечение животных с LLC ферментами приводит к значительному снижению числа метастазов. В группах животных с LLC, получавших лечение РНКазой А в дозах 0,5, 0,7 и 10 мг/кг, среднее число метастазов составило 14 ± 3, 15 ± 4 и 18 ± 4 соответственно. В группах животных с LLC, получавших лечение ДНКазой I в дозах 0,02, 0,12 и 2,3 мг/кг, среднее число метастазов составило 10 ± 4, 16 ± 7 и 18 ± 4, тогда как в группе животных, не получавших лечения, среднее число метастазов было 30 ± 5. Таким образом, наблюдаемое количество метастазов в группах животных с LLC, получавших лечение ферментами, было в 2–3 раза меньше по сравнению с контролем.

Анализ метастазов в легких животных с LLC показал, что после лечения ферментами наряду с морфологическими изменениями в метастазах и значительным уменьшением их количества наблюдается также существенное уменьшение площади метастазов и их локализация в органе. На рис. 3 приведены легкие животных с LLC, не получавших лечения (рис. 3А), и легкие животных с LLC, получавших лечение ферментами (рис. 3Б и 3В). Отчетливо видно уменьшение количества метастатических очагов и площади метастазов.

ОЦЕНКА ТЕРАПЕВТИЧЕСКОЙ ЭФФЕКТИВНОСТИ ЛЕЧЕНИЯ ФЕРМЕНТАМИ ЖИВОТНЫХ С НА-1

Диффузная граница метастатических очагов в печеночной паренхиме не позволяла использовать микроскопию для подсчета количества метастазов в печени животных с НА-1. Поскольку в процессе развития опухолей, метастазирующих в печень, происходит увеличение веса печени, для оценки антиметастатической активности ферментов был использован печеночный индекс (НИ), $НИ = \frac{вес\ печени}{вес\ мыши} \times 100\%$, который отражает тяжесть заболевания: уменьшение НИ животных после лечения ферментами относительно НИ животных контрольной группы является критерием терапевтической эффективности лечения (ТЕ). Данные по среднему приросту веса печени (АЛІ) животных в группах с НА-1 относительно здоровых животных были использованы для оценки ТЕ (табл. 1). Из представленных данных видно, что у животных с НА-1, получавших лечение ферментами, наблюдается заметное

снижение НИ по сравнению с контролем. Терапевтическая эффективность (ТЕ) у животных с НА-1, получавших лечение РНКазой А, варьировала от 30 до 42 % и у животных с НА-1, получавших лечение ДНКазой I, – от 40 до 53 %.

Как упоминалось во введении для главного представителя семейства, панкреатической рибонуклеазы А, при высоких дозах фермента (свыше 10 мг/кг) была ранее показана лишь слабая противоопухолевая активность [14, 15], а для ДНКазы I была показана способность подавлять рост метастазов [21, 22].

ОБСУЖДЕНИЕ

В данной работе мы исследовали противоопухолевую и антиметастатическую активность РНКазы А *in vivo*, используя дозы от 0,1 мкг/кг до 10 мг/кг. Мы показали, что внутримышечное введение РНКазы А в дозах 0,5–50 мкг/кг приводит к замедлению роста первичной опухоли на 20–40 %, при этом противоопухолевый эффект более выражен на ранних стадиях развития опухоли (8-й день). РНКазы А в дозах свыше 0,5 мг/кг не влияла на рост опухоли, что согласуется с полученными ранее данными других исследователей [17, 25]. Введение ДНКазы I в дозах 0,02–2,3 мг/кг не приводило к замедлению роста первичной опухоли. Было обнаружено, что внутримышечное введение и РНКазы А и ДНКазы I приводит к значительному (в 2–3 раза) уменьшению числа и размеров метастазов в легких животных с LLC. В случае гепатомы НА-1 внутримышечное введение ферментов приводило к снижению веса печени животных по сравнению с контролем, а терапевтическая эффективность лечения составила 30–42 % для РНКазы А, и 40–53 % для ДНКазы I. Гистологический анализ легких и печени позволил выявить, что оба фермента оказывают сходное действие на очаги метастазирования и вызывают деструкцию опухолевых клеток и увеличение числа некрозов и апоптозов в очагах метастазирования. Полученные данные позволяют сделать вывод о том, что оба фермента проявляют высокую антиметастатическую активность.

На сегодняшний день отсутствует общепринятый механизм противоопухолевого действия рибонуклеаз. Наблюдаемый нами противоопухолевый эффект РНКазы А может реализовываться благодаря (1) деградации кодирующих внутриклеточных РНК и, как следствие, (а) нарушению синтеза белков [26, 27] и (б) изменению профиля экспрессии генов под действием продуктов расщепления РНК [28]; (2) деградации некодирующих РНК (pre-miРНК, miРНК

и siРНК [2, 29]; (3) дестабилизации структуры РНК [30]; (4) блокированию функций РНК [31]; (5) воздействию на пути сигналинга [32–34] и (6) выключению неконтролируемого потока калия через кальций-зависимые калиевые каналы в опухолевые клетки [35]. Также нельзя исключить какие-либо другие пока неизвестные механизмы.

Мы предполагаем, что антиметастатическое действие РНКазы А и ДНКазы I, так же как и противоопухолевое действие РНКазы А, связано с основной функцией этих ферментов, способностью расщеплять нуклеиновые кислоты. Однако нельзя утверждать, что противоопухолевый эффект РНКазы А реализуется за счет деградации внутриклеточной РНК опухолевых клеток, поскольку данные многих авторов однозначно подтверждают, что при проникновении РНКазы А в клетку происходит ее связывание с рибонуклеазным ингибитором [17].

Возможными мишенями для РНКазы А могут быть циркулирующие в плазме крови РНК, включая pre-miРНК и miРНК, участвующие в регуляции онкогенеза и инвазии [3, 36, 37]. Известно, что в злокачественных опухолях различного происхождения экспрессия большинства miРНК, участвующих в регуляции опухолеспецифичных генов, нарушена [38, 39]. Так, показано, что повышение экспрессии miR-9 в случае рака молочной железы приводит к снижению уровня E-кадгерина и усилению инвазии [40]. Было показано, что в плазме больных плоскоклеточным раком языка повышен уровень miR-184, которые оказывают стимулирующее влияние на антиапоптотические и пролиферативные свойства опухолевых клеток [41]. Мишенью для ДНКазы I могут быть внеклеточные опухолеспецифические ДНК, которые, согласно геном-генометастатической теории, способны трансфецировать клетки удаленных от первичной опухоли органов, приводя к развитию метастазов [4].

Известно, что некоторые пептиды небольшого размера в чрезвычайно невысоких концентрациях способны оказывать противоопухолевый эффект [42] и иммуностимулирующее действие [43, 44], однако механизм их действия еще до конца не выяснен. Нельзя исключить, что обнаружен-

ное в нашей работе антиметастатическое действие РНКазы А и ДНКазы I, наблюдаемое в диапазоне низких доз, может быть связано с образованием биогенных пептидов в результате протеолиза ферментов в кровотоке.

Исчезновение противоопухолевой активности РНКазы А при повышении дозы свыше 0.5 мг/кг и при долговременном введении фермента (наблюдаемое нами снижение противоопухолевого эффекта на 13-й день развития опухоли) может быть связано с образованием специфических антител против РНКазы А. Подтверждением этому являются признаки антигенной стимуляции иммунной системы, наблюдаемые после введения РНКазы А: увеличение содержания лимфоцитов в мозговом слое тимуса и селезенке, инверсия слоев тимуса и инфильтрация метастатических очагов мононуклеарами.

ВЫВОДЫ

В результате проведенных исследований мы показали, что внутримышечное введение РНКазы А и ДНКазы I оказывает системный эффект на злокачественные опухоли, который выражается в замедлении роста опухоли (РНКазы А), в снижении количества и площади метастазов и в деструктивных изменениях очагов метастазирования (оба фермента). При этом дозы ферментов, при которых наблюдается наибольшая антиметастатическая активность, не оказывают токсического действия на организм животных. Полученные данные позволяют предложить применение РНКазы А и ДНКазы I в качестве терапии сопроводения для лечения метастазирующих форм опухолей. ●

Работа поддержана Российским фондом фундаментальных исследований (грант № 09-04-01362), Программами Президиума РАН «Молекулярная и клеточная биология» и «Фундаментальные науки – медицине», Программой государственной поддержки молодых российских ученых и ведущих научных школ (гранты Президента РФ МК-309.2008.4 и НШ-3689.2008.4).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Dalmay T., Edwards D.R. // *Oncogene*. 2006. V. 25. № 46. P. 6170–6175.
- Ardelt B., Ardel W., Darzynkiewicz Z. // *Cell Cycle*. 2003. V. 2. № 1. P. 22–24.
- Iorio M.V., Ferracin M., Liu C.G. et al. // *Cancer Res*. 2005. V. 65. № 16. P. 7065–7070.
- Garcia-Olmo D., Garcia-Olmo D.C., Ontanon J. et al. // *Blood*. 2000. V. 95. № 2. P. 724–735.
- Kotchetkov R., Cinatl J., Krivtchik A.A. et al. // *Anticancer Res*. 2001. V. 21. P. 1035–1042.
- Soucek J., Pouckova P., Matousek J. et al. // *Neoplasma*. 1996. V. 43. № 5. P. 335–340.
- Cinatl J., Cinatl J., Kotchetkov R. et al. // *Int. J. Oncol*. 1999. V. 15. № 5. P. 1001–1009.
- Pouckova P., Zadinova M., Hlouskova D. et al. // *J. Control Release*. 2004. V. 95. № 1. P. 83–92.
- Rybak S.M., Pearson J.W., Fogler W.E. et al. // *J. Natl. Cancer Inst*. 1996. V. 88. № 11. P. 747–753.
- Lee I., Lee Y.H., Mikulski S.M. // *J. Surg. Oncol*. 2000. V. 73. № 3. P. 164–171.
- Costanzi J., Sidranski D., Navon A. et al. // *Cancer Invest*. 2005. V. 23. № 7. P. 643–650.
- Ledoux L. // *Nature*. 1955. V. 175. № 4449. P. 258–259.
- Ledoux L. // *Nature*. 1955. V. 176. № 4470. P. 36–37.
- De Lamirande G. // *Nature*. 1961. V. 192. P. 52–54.
- Roth J.S. // *Cancer Res*. 1963. V. 23. P. 657–666.
- Klink T.A., Raines R.T. // *J. Biol. Chem*. 2000. V. 275. P. 17463–17467.
- Leland P.A., Schultz L.W., Kim B.M., Raines R.T. // *Pro. Natl. Acad. Sci. USA*. 1998. V. 95. P. 10407–10412.
- Rutkoski T.J., Raines R.T. // *Curr. Pharm. Biotechnol*. 2008. V. 9. № 3. P. 185–189.
- Wu Y., Mikulski S.M., Ardel W. et al. // *J. Biol. Chem*. 1993. V. 268. № 14. P. 10686–10693.
- Kim J.S., Soucek J., Matousek J., Raines R.T. // *J. Biol. Chem*. 1995. V. 270. № 18. P. 10525–10530.
- Sugihara S., Yamamoto T., Tanaka H. et al. // *Br. J. Cancer*. 1993. V. 67. P. 66–70.
- Tokita K., Sugihara S., Hiraoka T. et al. // *Invasion Metastasis*. 1995. V. 15. P. 46–59.

- Silberklang M., Gillum A.M., RhajBhandary // *Methods Enzymol*. 1979. V. 59. P. 58–109.
- Tomayko M.M., Reynolds C.P. // *Cancer Chemother. Pharmacol*. 1989. V. 24. P. 148–154.
- Klink T.A., Raines R.T. // *Biol. Chem*. 2000. V. 275. P. 17463–17467.
- Kim J.S., Soucek J., Matousek J. et al. // *J. Biol. Chem*. 1995. V. 270. P. 31097–31102.
- Matousek J. // *Comp. Biochem. Physiol. C*. 2001. V. 129. P. 175–191.
- Haigis M.C., Raines R.T. // *J. Cell Sci*. 2003. V. 116. P. 313–324.
- Zhao H., Ardel B., Ardel W. et al. // *Cell Cycle*. 2008. V. 7. P. 3258–3261.
- Sorrentino S., Naddeo M., Russo A. et al. // *Biochemistry*. 2003. V. 42. P. 10182–10190.
- Blaszczak J., Gan J., Tropea J.E. et al. // *Structure*. 2004. V. 12. P. 457–466.
- Kojima K. // *Nagoya J. Med. Sci*. 1993. V. 56. P. 1–18.
- Ran S., Downes A., Thorpe P.E. // *Cancer Res*. 2002. V. 62. P. 6132–6140.
- Ilinskaya O.N., Dreyer F., Mitkevich V.A. et al. // *Protein Sci*. 2002. V. 11. P. 2522–2525.
- Ilinskaya O.N., Koschinski A., Mitkevich V.A. et al. // *Biochem. Biophys. Res. Commun*. 2004. V. 314. P. 550–554.
- Zhang B., Pan X., Cobb G.P. et al. // *Dev. Biol*. 2007. V. 302. P. 1–12.
- Wong T.S., Liu X.B., Wong B.Y. et al. // *Clin. Cancer Res*. 2008. V. 14. P. 2588–2592.
- Garzon R., Fabbri M., Cimmino A. et al. // *Trends Mol. Med*. 2006. V. 12. № 12. P. 580–587.
- Zhang B., Pan X., Cobb G.P. et al. // *Dev. Biol*. 2007. V. 302. № 1. P. 1–12.
- Iorio M.V., Ferracin M., Liu C.G. et al. // *Cancer Res*. 2005. V. 65. № 16. P. 7065–7070.
- Wong T.S., Liu X.B., Wong B.Y. et al. // *Clin. Cancer Res*. 2008. V. 14. № 9. P. 2588–2592.
- Fauve R.M. // In: Azuma I., Jollès G. (ed) *Immunostimulants: Now and Tomorrow*. 1987. Springer-Verlag, Berlin. P.225–234.
- Januaz M., Wiczorek Z., Spiegel K. et al. // *Mol. Immunol*. 1987. V. 249. № 10. P. 1029–1031.
- Vanhooft G., Goossens F., De Meester I. et al. // *The FASEB Journal*. 1995. V. 9. P. 736–744.