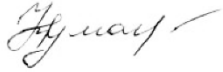
На правах рукописи

МИРОНОВА НАДЕЖДА ЛЬВОВНА

МЕХАНИЗМЫ ПОДАВЛЕНИЯ ПРОГРЕССИИ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫХ ОПУХОЛЕЙ ПОД ДЕЙСТВИЕМ ДЕНДРИТНЫХ КЛЕТОК И ПРИРОДНЫХ НУКЛЕАЗ

03.01.04 – биохимия



Автореферат
диссертации на соискание учёной степени
доктора биологических наук

Новосибирск – 2018

Работа выполнена в Федеральном государственном бюджетном учреждении науки Институте химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН

Научный консультант:

Зенкова Марина Аркадьевна, д.б.н., профессор,
Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, зав. лабораторией

Официальные оппоненты:

Купраш Дмитрий Владимирович, д.б.н., чл.-корр. РАН,
Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта РАН, зав. лабораторией

Ильинская Ольга Николаевна, д.б.н., профессор,
Федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего образования «Казанский (Приволжский) федеральный университет», зав. кафедрой

Толстикова Татьяна Генриховна, д.б.н., профессор,
Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Новосибирский институт органической химии им. Н.Н. Ворожцова СО РАН, зав. лабораторией

Ведущая организация: Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Научно-исследовательский институт фундаментальной и клинической иммунологии»

Защита состоится « 25 » мая 2018 г. в 10^{00} часов
на заседании диссертационного совета Д 003.045.01 на базе ФГБУН Института химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН
по адресу: 630090, Новосибирск-90, пр. Лаврентьева, 8

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке
Института химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН

Автореферат разослан « ___ » _____ 2018 г.

Учёный секретарь диссертационного совета
к.х.н., доцент Коваль В. В.

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы исследования

Развитие опухоли сопровождается быстрой пролиферацией, потерей дифференциации, развитием устойчивости опухолевых клеток к гибели, перепрограммированием энергетического метаболизма, потерей адгезии между клетками и опухолевым матриксом, уклонением от иммунного надзора, иммуносупрессией, индукцией ангиогенеза, инфильтрационным ростом и метастазированием. Наиболее важной чертой опухолевой прогрессии является активация функционирования внутриклеточных регуляторных каскадов, направленных на поддержание выживаемости опухолевых клеток, что позволяет поврежденным клеткам адаптироваться к избирательному давлению, ускользать от узко сфокусированных терапевтических препаратов, а также рекрутировать соседние нормальные клетки, которые образуют микроокружение опухоли и усиливают ее прогрессию.

На всех этапах опухолевой прогрессии принимают участие опухоль-ассоциированные нуклеиновые кислоты (НК), которые играют двоякую роль. С одной стороны, опухоль-ассоциированные НК играют отрицательную роль и способствуют прогрессии опухоли, с другой стороны, являются важным звеном, формирующим противоопухолевый иммунитет. Среди важных опухоль-ассоциированных РНК выделяют: внутриклеточные кодирующие РНК, определяющие направленность метаболических путей, контроля клеточного цикла, ангиогенеза, адгезии, апоптоза и путей онкотрансформации, таких как PI3K/AKT, TGF-β, JAK/STAT и MAPK; внутриклеточные и внеклеточные регуляторные РНК, участвующие в аутокринной и паракринной регуляции экспрессии их прото-онкогенных и онкосупрессорных мРНК. Среди ДНК, которые могут принимать участие в канцерогенезе, выделяют: внеклеточные ДНК в составе ДНК/белковых комплексов и микровезикул, участвующие в трансформации нормальных клеток, в том числе ретротранспозонные ДНК; продуцируемые опухолью ДНК, участвующие в усилении нейтрофильных ловушек (NET), способствующих миграции и инвазии опухоли.

Полученные многочисленные данные об участии опухоль-ассоциированных НК в канцерогенезе и в метастазировании позволили по-новому взглянуть на НК-расщепляющие ферменты, как на возможные противоопухолевые и антиметастатические агенты. В мире широким фронтом ведутся исследования противоопухолевого потенциала экзогенных рибонуклеаз. На сегодняшний день продемонстрирован высокий противоопухолевый потенциал различных природных рибонуклеаз - BS-РНКазы из семенников быка и онконазы из ооцитов *Rana pipiens*, относящихся к семейству РНКазы А, а также ряда микробных нуклеаз. Однако данные по исследованию противоопухолевого потенциала наиболее каталитически активного представителя семейства РНКазы А бычьей панкреатической РНКазы А оказались противоречивыми. В ряде работ была продемонстрирована ее высокая противоопухолевая активность, тогда как в других – ее полное отсутствие. Таким образом, противоопухолевый потенциал РНКазы А оставался невыясненным.

Микробная рибонуклеаза *Bacillus intermedius* (биназа) является представителем семейства РНКазы Т1 с относительно недавно открытой противоопухолевой активностью. Для нее было продемонстрировано цитотоксическое действие против ряда опухолевых клеток, что делает ее перспективной для исследования противоопухолевого потенциала *in vivo*.

Среди ДНКаз внимание исследователей привлекли два фермента: панкреатическая ДНКаза I быка и рекомбинантная ДНКаза I человека (дорназа альфа). На ряде линий опухолевых клеток и на модели рака поджелудочной железы была продемонстрирована способность ДНКазы I снижать их пролиферацию. Предпринимались попытки применять ДНКазу I для лечения пациентов с различными метастатическими формами рака. Однако, несмотря на прогресс в этой области, информация о противоопухолевой активности ДНКазы I и механизмах, опосредующих эту активность, остается фрагментарной и не до конца выясненной.

Следует отметить и положительную роль опухоль-ассоциированных нуклеиновых кислот в формировании противоопухолевого иммунитета. Известно, что клетки опухолей часто экспрессируют ряд белков, которые отсутствуют или экспрессируются на низком уровне в нормальных клетках. Такие белки, а, следовательно, и кодирующие их РНК, могут выступать в роли опухолеспецифических антигенов (ОАГ) для антиген-презентирующих клеток, в частности, дендритных клеток (ДК). В настоящее время разработаны схемы лечения онкологических заболеваний пациентов с применением ДК, нагруженных опухолеспецифическими антигенами. Предшественники ДК получают из костного мозга или периферической крови пациента, далее культивированием в присутствии коктейля цитокинов из них получают незрелые ДК. Параллельно у пациента берется опухолевый материал, который и служит источником опухолевых белков или опухоль-ассоциированных нуклеиновых кислот для нагрузки ДК. Далее ДК вводят обратно пациенту, где они способны находить и активировать опухолеспецифические цитотоксические Т-лимфоциты (ЦТЛ), способные уничтожать опухолевые клетки. Таким образом, для получения ДК-вакцин с высокой противоопухолевой активностью крайне актуальным является поиск иммуногенных опухоль-ассоциированных антигенов и систем их доставки в ДК.

Цели и задачи исследования.

Целью настоящей работы являлось исследование противоопухолевого и иммуностимулирующего потенциала природных нуклеаз и дендритных клеток, оказывающих свое действие на разных уровнях опухолевой прогрессии и взаимодействия опухоли с иммунной системой, на экспериментальных моделях опухолей мыши.

(1) модифицированных дендритных клеток, способных эффективно экспрессировать и презентировать опухолеспецифические антигены и запускать противоопухолевый цитотоксический Т-клеточный ответ, позволяющий избегать уклонения опухоли от иммунного надзора.

(2) природных белков с нуклеазной активностью, способных вызывать неспецифическую деградацию нуклеиновых кислот, участвующих в процессах трансформации опухолевой клетки и диссеминации опухоли по организму.

В ходе исследования решались следующие задачи:

1. Разработка прототипов дендритно-клеточных вакцин, основанная на принципе высокоэффективной и избирательной доставки опухолеспецифической РНК с помощью липосомальных композиций, в том числе и адресованных к лектиновым рецепторам антиген-презентирующих клеток.

2. Исследование противоопухолевого и антиметастатического потенциала природных нуклеаз бычьей панкреатической РНКазы А, бычьей панкреатической ДНКазы I и микробной рибонуклеазы *Bacillus intermedius* (биназы) на экспериментальных опухолевых моделях мыши и поиск корреляций между ферментативной активностью нуклеаз и противоопухолевым эффектом.

3. Изучение иммуномодулирующего действия ДК-вакцин, РНКазы А, ДНКазы I и биназы *in vivo*, вносящего вклад в противоопухолевый ответ.

4. Исследование механизма противоопухолевого действия РНКазы А и ДНКазы I.

Научная новизна полученных результатов

В рамках работы впервые получены прототипы высокоэффективных дендритно-клеточных вакцин, нагруженные комплексами опухолеспецифической РНК в составе мультикомпонентных адресных липосом, состоящих из липида на основе двух остатков холестерина, липида-хелпера и липоконъюгата, содержащего остаток маннозы, присоединенный к диалкилглицерину с помощью сквратного линкера. Показана способность ДК-вакцин эффективно подавлять рост экспериментальных опухолей различного гистогенеза и метастазирование. В том числе показано, что профилактическая схема лечения ДК-вакцинами наиболее эффективна в отношении высокоагрессивных метастазирующих опухолей, тогда как терапевтическая схема - неметастазирующих опухолей. Показано, что липоплексы опухолевой РНК и адресных липосом могут быть применены для индукции противоопухолевого ответа, как бесклеточные вакцины, минуя стадию приготовления ДК-вакцин.

Впервые продемонстрирован противоопухолевый и антиметастатический потенциал бычьей панкреатической РНКазы А и микробной рибонуклеазы *Bacillus intermedius* (биназы) и антиметастатический потенциал бычьей панкреатической ДНКазы I на широком спектре опухолевых моделей, и выявлены перспективы дальнейшего исследования этих ферментов в качестве противоопухолевых препаратов.

Впервые показано, что противоопухолевое и антиметастатическое действие РНКазы А реализуется за счет снижения уровня циркулирующих миРНК и индукции их синтеза в опухоли, повышения функционирования метаболических каскадов опухолевой клетки, в частности, окислительного фосфорилирования, и ингибирования сигнальных путей, участвующих в злокачественной

трансформации. Впервые показано, что антиметастатическое действие ДНКазы I реализуется за счет деградации специфических последовательностей опухоль-ассоциированных ДНК в крови животных-опухоленосителей: фрагментов онкогенов *Hmga2, Myc, Jun* и фрагментов тандемных повторов подсемейств L1 и подсемейств B1-B4, относящихся к ретротранспозонам, которые участвуют в процессе метастазирования.

Практическая значимость

Опухоль-ассоциированные нуклеиновые кислоты играют важную роль на всех этапах опухолевой прогрессии. Автором выявлен ряд значимых опухоль-ассоциированных миРНК, мРНК, тандемных повторов и онкогенов мыши, ортологи которых у человека могут быть использованы в качестве молекулярных маркеров для диагностики опухолевых заболеваний, ответа на лечение и мишеней для ген-направленной терапии. Автором получены ДК-вакцины, способные индуцировать эффективный противоопухолевый иммунный ответ на экспериментальных опухолях мыши, которые могут быть предложены в качестве прототипов ДК-вакцин для лечения онкологических заболеваний человека. Выявлен высокий противоопухолевый и антиметастатический потенциал бычьей панкреатической РНКазы А, микробной рибонуклеазы *Bacillus intermedius* (биназы) и бычьей панкреатической ДНКазы I на экспериментальных опухолях мыши, что позволяет рассматривать эти нуклеазы как перспективные агенты адьювантной противоопухолевой терапии человека.

Основные положения, выносимые на защиту

- Прототипы дендритно-клеточных вакцин, основанные на принципе избирательной и высокоэффективной доставки опухолеспецифической РНК в составе мультикомпонентных адресных липосом, проявляют высокую противоопухолевую и антиметастатическую активность на широком спектре экспериментальных опухолей различного гистогенеза и активируют иммунный надзор за опухолью. Бесклеточные вакцины на основе опухолеспецифической РНК и мультикомпонентных адресных липосом сравнимы по эффективности с дендритно-клеточными-вакцинами.

- Бычья панкреатическая РНКаза А и микробная рибонуклеаза *Bacillus intermedius* (биназа) проявляют высокую противоопухолевую и антиметастатическую активность, бычья панкреатическая ДНКаза I проявляет антиметастатическую активность на широком спектре экспериментальных опухолей различного гистогенеза, и вызывают индукцию противоопухолевого иммунного ответа.

- Снижение инвазивного потенциала опухоли под действием РНКазы А сопровождается снижением уровня миРНК в крови животных-опухоленосителей и индукцией их синтеза в опухолевых клетках. Изменение репертуара миРНК в опухоли повышает функционирование энергетических каскадов, вызывает перераспределение в эффективности функционирования событий опухолевой прогрессии, связанных с регулированием клеточного роста и диссеминации, а также ослабляет функционирование сигнальных путей, участвующих в злокачественной трансформации.

- Антиметастатическое действие ДНКазы I ассоциировано с деградацией специфических внДНК в кровотоке животных-опухоленосителей, и основными ее мишенями являются фрагменты опухоль-ассоциированных генов *Hmga2*, *Myc* и *Jun* и тандемных повторов подсемейств B1-B4 и L1.

Апробация работы и публикации

По материалам работы опубликовано 22 статьи в рецензируемых журналах, цитируемых в базах Web of Science и SCOPUS, и один патент. Результаты работы были представлены на российских и международных конференциях: Cell signaling world 2006 (Luxembourg, 2006); 32nd FEBS Congress (Vienna, Austria, 2007); «Фундаментальные науки – медицине» (Новосибирск, Россия, 2006, 2007, 2008, 2010, 2013); Apoptosis world 2008 (Luxemburg, 2008); Mechanisms of early differentiation: embryogenesis, myogenesis (cardiac differentiation) and hematopoiesis/lymphopoiesis (Barsinghausen, Germany, 2008); IV съезд Российского общества биохимиков и молекулярных биологов (Новосибирск, Россия, 2008); Молекулярная онкология (Новосибирск, Россия, 2008); Cancer immunotherapy and immunomonitoring (CITIM)» (Kiev, Ukraine, 2009); Медицинская геномика и протеомика (Новосибирск, Россия, 2009); 46th International conference on medicinal chemistry (Reims, France, 2010); European school of medicinal chemistry (Urbino, Italy, 2010); 8th RNase Congress, (Naples, Italy, 2010); Cell Signal-omics 2011, Integrated cellular pathology, Systems biology of human disease (Luxembourg, 2011); 36th FEBS Congress (Torino, Italy, 2011); «Физико-химическая биология», посвященная 90-летию академика Д.Г. Кнорре (Новосибирск, Россия, 2016); Congress 22nd IUBMB and 37th FEBS (Seville, Spain, 2012); 20th Euroconference on apoptosis (Rome, Italy, 2012); International conference on postgenomic technology for biomedicine, (Novosibirsk, Russia, 2012); ICDS Congress “Mechanisms of Cell Death: The Command to Die” (Fuengirola, Spain, 2013); 38th FEBS Congress (Saint-Petersburg, Russia, 2013); 9th Annual meeting of the oligonucleotide therapeutic society (Napoli, Italy, 2013); FEBS EMBO 2014 Conference (Paris, France, 2014); VII Российский симпозиум «Белки и пептиды» (Новосибирск, Россия, 2015); 4th Annual congress of the European society for translational medicine (Prague, Czech Republic, 2016); V Съезд биохимиков России (Сочи, Россия, 2016); Всероссийская конференция с международным участием «Биотехнология – медицине будущего» (Новосибирск, Россия, 2017); 5th Annual Congress on clinical & translational science (Berlin, Germany, 2017).

Личный вклад автора

Представленные в работе экспериментальные данные получены лично автором, либо при его непосредственном участии на всех этапах исследования, включая планирование и проведение экспериментов, обработку, оформление и публикацию результатов.

Идеологическое планирование работы проведено совместно с д.б.н., профессором Зенковой М.А и научным руководителем института академиком Власовым В.В. (ИХБФМ СО РАН). Эксперименты с животными на опухолевых моделях проведены совместно с к.б.н., профессором Поповой Н.А., к.б.н.

Калединым В.И., к.м.н. Николиным В.П. (ИЦиГ СО РАН) к.б.н. Патутиной О.А., к.б.н. Марковым О.В. и к.м.н. Сеньковой А.В. (ИХБФМ СО РАН).

Эксперименты по исследованию противоопухолевого действия биназы спланированы и проведены совместно с академиком Макаровым А.А., к.х.н. Митькевичем В.А. и к.ф.-м.н. Петрушанко И.Ю. (ИМБ РАН) и д.б.н., профессором Зенковой М.А. (ИХБФМ СО РАН). Поликатионные липосомы серии N-DOPE и МЛ были синтезированы и любезно предоставлены к.х.н. Шмендель Е.В. и д.х.н., профессором Масловым М.А. (МИРЭА, Москва).

Патоморфологический анализ гистологических образцов проведен к.м.н. Сеньковой А.В. (ИХБФМ СО РАН), д.м.н. Малковой Е.М., Тарановым О.С. (ГНЦ ВБ«Вектор») и д.б.н., профессором Рябчиковой Е.И. (ИХБФМ СО РАН). Анализ уровня миРНК с помощью qПЦР проведен к.б.н. Патутиной О.А. (ИХБФМ СО РАН). Секвенирование ДНК-библиотек, полученых из РНК и внДНК, проведено к.б.н. Бреннером Е.В. (ИХБФМ СО РАН). Первичная обработка данных секвенирования проведена к.б.н. Курильщиковым А.М. (ИХБФМ СО РАН). Вторичная обработка данных секвенирования ДНК-библиотек, полученных из внДНК, проведена совместно с Алексеевой Л.А. (ИХБФМ СО РАН).

В работу вошли результаты кандидатских диссертаций к.б.н. Патутиной О.А. и к.б.н. Маркова О.В., выполненных под руководством автора.

Объем и структура диссертации.

Диссертация состоит из введения, обзора литературы, материалов и методов исследования, результатов собственных исследований и их обсуждения, выводов, приложений и списка цитируемой литературы (681 ссылка). Текст изложен на 317 страницах, иллюстрирован 60 рисунками, включает 27 таблиц.

СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

1. Опухолевые модели, использованные в эксперименте

Для исследования противоопухолевого потенциала дендритных клеток и природных нуклеаз в работе были использованы экспериментальные модели опухолей мыши. Модели, формирующие первичный узел и метастазы: карцинома легких Льюис (LLC) на мышах линии C57Bl/6J, метастазирующая в легкие; гепатома HA-1 на мышах линии A/Sn и лимфосаркома RLS_{40} на мышах линии CBA, метастазирующие в печень (Таблица 1). Модели, формирующие первичный узел без метастазов: аденокарцинома Кребс-2 на мышах линии C57Bl/6J (Таблица 1). Также были использованы метастатические модели без первичного опухолевого узла: карцинома легких Льюис (LLC) на мышах линии C57Bl/6J и меланома B16, метастазирующие в легкие (Таблица 1). Мышей выводили из эксперимента на 15 (меланома B16), 19 (Кребс-2) и 20 (LLC, RLS_{40} и HA-1) дни развития опухолей.

2. Выбор поликатионных липосом, эффективно доставляющих нуклеиновые кислоты в ДК

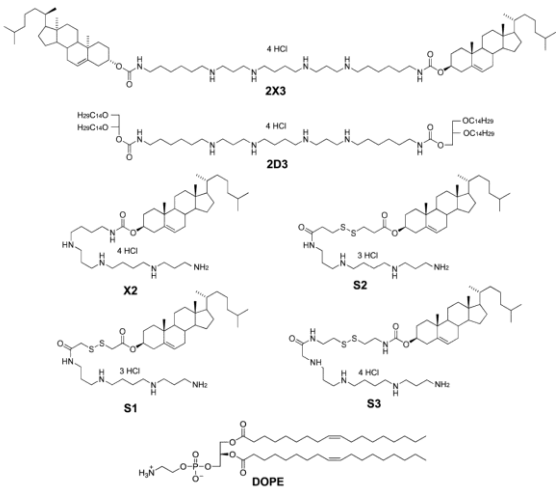
В работе использовали предшественники ДК (преДК), полученные из костного мозга мышей линии C57Bl/6J, и незрелые ДК. Незрелые ДК получали

Таблица 1. Модели опухолей мыши, использованные в эксперименте.

	Модель	Линия мышей	Число транс-плантируемых клеток/тип введения	Метаста-зирование
Модели с первичным опухолевым узлом				
1	Карцинома легких Льюис (LLC)	C57Bl/6J	6×10^5 - 10^6 кл/0.1 мл/ внутримышечно (в/м)	легкие
2	Гепатома 1A (HA-1)	A/Sn	10^6 кл/0.1 мл/ внутримышечно (в/м)	печень
3	Лимфосаркома RLS_{40}	CBA	10^6 кл/0.1 мл/ внутримышечно (в/м)	печень
4	Аденокарцинома Кребс-2	CBA	10^5 кл/0.1 мл/ внутримышечно (в/м)	нет
Метастатические модели без первичного опухолевого узла				
5	Меланома B16	C57Bl/6J	10^5 кл/0.1 мл/ внутривенно (в/б)	легкие
6	Карцинома легких Льюис (LLC)	C57Bl/6J	1.25×10^5 кл/0.1 мл/ внутривенно (в/б)	легкие

культивированием преДК или CD11c+ преДК в присутствии ИЛ-4 и ГМ-КСФ в течение 6 дней. ДК вакцину получали нагрузкой незрелых ДК ОАГ в виде опухолевого лизата (пассивным методом) или суммарной опухолевой РНК (в комплексах с катионными липосомами, КЛ). Степень зрелости ДК определяли по морфологическим характеристикам: наличию разветвленных отростков плазматической мембраны, так называемых дендритов.

На первом этапе исследовали серию катионных липосом N-DOPE, состоящих из поликатионных липидов на основе остатков холестерина или диалкилглицерина, связанных со сперминoм, и липида-хелпера диолеоилфосфатидилэтаноламина (DOPE). Структуры катионных липидов и их химические названия приведены на Рис. 1. Липиды были синтезированы и любезно предоставлены для работы к.х.н. Шмендель Е. В. и д.х.н., профессором Масловым М. А. (МИРЭА, Москва). Поликатионные липиды содержали один (липиды X2, S1, S2 и S3) или два (2X3) остатка холестерина или диалкилглицерина (2D3), связанных со сперминoм. КЛ содержали поликатионный липид и DOPE в молярном отношении 1:1. Для оценки способности КЛ доставлять нуклеиновые кислоты в клетки была изучена доставка плазмидной ДНК pEGFP-C2, из кодирующей зеленый флуоресцентный белок (EGFP), и суммарной РНК клеток ВНК IR-780, экспрессирующих EGFP (далее РНК-EGFP), в мышиные CD11c+ преДК и незрелые ДК с помощью проточной цитометрии. Липоплексы, состоящие из pEGFP-C2 или РНК-EGFP и исследуемых липосом, добавляли к клеткам, и эффективность доставки оценивали по эффективности внутри-клеточного синтеза зеленого флуоресцентного белка.



Две композиции 2X3-DOPE и 2D3-DOPE обладали высокой эффективностью трансфекции (Таблица 2). Заметная эффективность доставки была показана для КЛ X2-DOPE и S2-DOPE, тогда как S1-DOPE и S2-DOPE показали низкий уровень трансфекции. Для липосом 2X3-DOPE, 2D3-DOPE и X2-DOPE была показана эффективная доставка pEGFP-C2 в незрелые ДК (Таблица 2).

Рис. 1. Структуры компонентов поликатионных липосом серии N-DOPE. 2X3 - 1,26-бис(холест-5-ен-3β-илоксикарбониламино)-7,11,16,20-тетраазагексакозан тетрагидрохлорид; 2D3 - 1,26-бис(1,2-ди-O-тетрадецил-*rac*-глицерин)-7,11,16,20-тетраазагексакозан тетрагидрохлорид; X2 – 1,17-диамино-N1-[(холест-5-ен-3β-ил)оксикарбонил]-5,9,14-триазагептадекан тетрагидрохлорид; S1 - (холест-5-ен-3β-ил)-19-амино-3,4-дитиа-6-оксо-7,11,16-триазадодеканоат тригидрохлорид; S2 – (холест-5-ен-3β-ил)-21-амино-4,5-дитиа-8-оксо-9,13,18-триазагенэйкозаноат тригидрохлорид; S3 – 1,22-диамино-N1-[(холест-5-ен-3β-ил)оксикарбонил]-3,4-дитиа-8-оксо-7,10,14,19-тетраазадокозан тетрагидрохлорид, DOPE - 1,2-диолеоил-*sn*-глицеро-3-фосфоэтаноламин.

Оказалось, что те же КЛ, которые опосредовали эффективную доставку плазмидной ДНК, за исключением X2-DOPE, эффективно доставляли РНК-EGFP в преДК и незрелые ДК: 2X3-DOPE, 2D3-DOPE и S2-DOPE. Липосомы S1-DOPE доставляли РНК-EGFP в преДК с наименьшей эффективностью.

Сравнение 2X3-DOPE и 2D3-DOPE, содержащих в качестве гидрофобных доменов холестерин и диалкилглицерин, соответственно, показало, что тип гидрофобного домена не оказывает значительного влияния на трансфекционную активность липосом. С другой стороны, количество гидрофобных доменов, введенных в состав липосом, оказывает существенное влияние.

3. Мультикомпонентные адресные поликатионные липосомы серии МЛ

Для конструирования таргетных липосом использовали принцип модульности, основанный на сборке липосом из нескольких компонентов, включая катионный липид, липид-хелпер DOPE и липоконъюгаты, содержащие в своем составе остатки маннозы, способные с высокой эффективностью взаимодействовать с лектиновыми рецепторами ДК. В качестве основы таргетных липосом были выбраны липосомы 2X3-DOPE, которые при доставке, как ДНК, так и РНК, показали лучшее соотношение TE / MFI.

Таблица 2. Доставка pEGFP-C2 с помощью липосом N-DOPE в преДК и незрелые ДК.

	Липосомы	Флуоресцентные клетки (ТЕ, %) / Интенсивность флуоресценции (MFI, RFU)			
N/P		**4/1**	**6/1**	**8/1**	**10/1**
преДК	**LF**	0.2 / 0.6			
	2X3-DOPE	21.2 / 2.1	22.1 / 1.8	25.1 / 1.9	32.8 / 2.0
	2D3-DOPE	17.1 / 0.5	21.3 / 0.8	24.0 / 1.7	31.0 / 2.2
	X2-DOPE	15.7 / 0.8	19.4 / 0.5	38.0 / 0.5	47.3 / 0.7
	S1-DOPE	9.2 / 1.0	9.8 / 0.8	11.0 / 0.8	10.3 / 0.9
	S2-DOPE	16.2 / 0.2	15.4 / 0.4	18.5 / 0.5	27.3 / 0.9
	S3-DOPE	9.5 / 1.3	10.9 / 1.3	10.0 / 1.4	10.2 / 1.9
Незрелые ДК	**LF**	-	-	9.7 / 0.02	
	2X3-DOPE	-	-	31.9 / 1.9	35.8 / 1.3
	2D3-DOPE	-	-	33.6 / 0.8	43.6 / 1.0
	X2-DOPE	-	-	40.1 / 0.02	45.8 / 0.01
	S2-DOPE	-	-	27.2 / 1.4	35.5 / 1.5

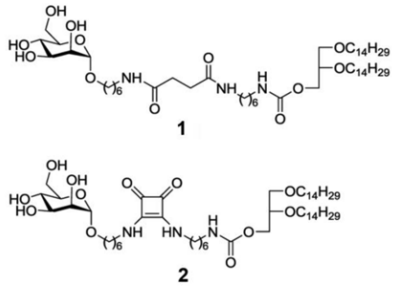
Липосомы состояли из поликатионных липидов и липида DOPE (1:1, мол. отн.) ТЕ (количество флуоресцентных клеток и интенсивность флуоресценции) оценивали через 48 ч после трансфекции. Данные представлены в виде MEAN. Значения S.E.M. не превышали 10%. «–» - не проводили исследование.

Липосомы МЛ состояли из липидов 2X3 и DOPE (1:2 мол. отн.) с добавлением 2.5, 5 или 10% мол. маннозо-модержащих липоконъюгатов **1** (липосомы М1, М2, М3, соответственно) или **2** (липосомы М4, М5, М6, соответственно) (Рис. 2). Липоконъюгаты **1** и **2** состояли из биосовместимых компонентов и содержали остаток D-маннозы, соединенный с диалкилглицерином через сукцинильный или скваратный линкеры, отличающиеся друг от друга пространственной структурой и гибкостью (Рис. 2).

Анализ физико-химических свойств липосом МЛ показал, что их средний диаметр больше, чем у ко́ровых липосом 2X3-DOPE. Липосомы М1 – М3, содержащие липоконъюгат **1**, обладали самыми большими размерами (около 120 нм), причем процентное содержание липоконъюгата не влияло на размер липосом. Размер липосом М4 – М6 уменьшался со 100 нм до 54 нм с увеличением содержания липоконъюгата **2** в липосомах и был близок к диаметру липосом 2X3-DOPE. Исследованные липоплексы, сформированные при низких соотношениях N/P 2/1 и 1/1, имели отрицательный поверхност-ный заряд, который становился положительным при увеличении N/P до 4/1.

Содержание маннозных рецепторов на поверхности преДК и незрелых ДК определяли путем окрашивания клеток mAb к CD206. Согласно полученным данным около 4% преДК и 45% незрелых ДК экспрессируют на своей поверхности маннозные рецепторы CD206.

А



Б

Процентное содержание липида	Липосомы МЛ					
	М1	М2	М3	М4	М5	М6
2Х3	48.25	47.5	45	48.25	47.5	45
DOPE	48.25	47.5	45	48.25	47.5	45
1	2.5	5	10	-	-	-
2	-	-	-	2.5	5	10

Рис. 2. А. Структуры маннозо-содержащих липоконъюгатов, входящих в состав липосом серии МЛ**. Б.** МЛ состояли из катионного липида 2Х3, липида-хелпера DOPE (1 : 2 мол. отн.) и липоконъюгатов **1** (1-[6-(α-D-маннопиранозилокси)гексил]амино-4-{6-[*rac*-2,3-ди(тетрадецилокси)проп-1-илоксикарбониламино]гексил}аминобутан-1,4-дион) и **2** (3-[6-(α-D-маннопиранозилокси)гексил]амино-4-{6-[*rac*-2,3-ди(тетрадецилокси)проп-1-илоксикарбониламино]гексил}аминоциклобут-3-ен-1,2-дион).

При соотношении N/P 1/1 и 2/1, когда заряды липоплексов являются отрицательными, нейтральными или умеренно положительными, больший вклад в эффективность трансфекции по нашим предположениям будет вносить рецептор-опосредованная доставка. Показано, что при N/P 1/1 и 2/1 эффективность доставки pEGFP-C2 с помощью липосом МЛ в преДК была достаточно мала, что, по всей вероятности, связано с низкой плотностью маннозных рецепторов на поверхности преДК.

При высоких соотношениях N/P (от 4/1 до 10/1), с учетом положительного заряда липоплексов, основной вклад будет определяться электростатическими взаимодействиями между положительно заряженными липоплексами и отрицательно заряженной клеточной мембраной ДК. Действительно, при данных N/P наблюдалось повышение эффективности трансфекции pEGFP-C2 в преДК: липосомы М4, М5 и М6 в 1.2 – 1.4 раза более эффективно доставляли pEGFP в преДК по сравнению с липосомами 2Х3-DOPE, однако интенсивность флуоресценции клеток была примерно одинакова для всех липосом. Данные по доставке pEGFP с помощью МЛ в незрелые ДК с высоким содержанием маннозных рецепторов показали, что при соотношении N/P 4/1 МЛ проявляли одинаковую или более низкую (для липосом М2 и М3) эффективность трансфекции по сравнению с липосомами 2Х3-DOPE.

Доставку РНК-EGFP в комплексах с МЛ осуществляли при низких соотношениях N/P 1/1 и 2/1 (Таблица 3), при которых основным механизмом трансфекции является рецептор-опосредованный эндоцитоз. При N/P 1/1 липосомы М3 наиболее эффективно доставляли РНК-EGFP в преДК по сравнению с другими МЛ и липосомами 2Х3-DOPE (Таблица 3). Другие липоплексы МЛ/РНК-EGFP, сформированные при N/P 1/1, не отличались

по ТЕ от 2X3-DOPE. Увеличение соотношения N/P привело к повышению ТЕ для всех исследованных липосом (Таблица 3).

Доставка РНК-EGFP в незрелые ДК с помощью МЛ при N/P 2/1 показала, что липосомы М1 и М4 - М6 обладали высоким уровнем ТЕ, сравнимым с 2X3-DOPE (Таблица 3), при этом уровень интенсивности флуоресценции в 1.4 раза превышал таковой для клеток, трансфицированных 2X3-DOPE. Наименее эффективными липосомами для доставки РНК в незрелые ДК оказались М3.

Таблица 3. Доставка РНК-EGFP в преДК и незрелые ДК с помощью липосом МЛ.

	Липосомы[1)]	**Флуоресцентные клетки (ТЕ, %) / Интенсивность флуоресценции (MFI, RFU)[2)]**	
N/P		**1/1**	**2/1**
преДК	**LF**	2.8 / 0.1	
	2X3-DOPE	19.5 / 1.4	49.9 / 6.6
	M1	15.4 / 1.4	21.6 / 2.3
	M2	19.6 / 1.9	30.5 / 6.6
	M3	34.9 / 3.6	31.8 / 4.3
	M4	19.3 / 2.0	29.8 / 2.5
	M5	17.4 / 1.2	45 / 2.6
	M6	20.4 / 1.6	35.6 / 6.0
незрелые ДК	**LF**	-	-
	2X3-DOPE	-	44.3 / 6.4
	M1	-	46.9 / 8.8
	M2	-	31.9 / 6.0
	M3	-	29.8 / 3.0
	M4	-	43.3 / 9.2
	M5	-	40.7 / 8.3
	M6	-	39.6 / 9.1

[1)] Состав липосом приведен на Рис. 3. [2)] ТЕ (количество флуоресцентных клеток и интенсивность флуоресценции) оценивали через 48 ч после трансфекции по уровню экспрессии зеленого флуоресцентного белка. ТЕ Lipofectamine 2000 (LF) и липосом 2X3-DOPE использовали в качестве контроля. Данные представлены в виде MEAN. Значения S.E.M. не превышали 10%.

4. Доказательство адресности липосом серии МЛ

При взаимодействии ДК с наивными Т-лимфоцитами происходит их дифференцировка в антиген-специфические эффекторные Т-клетки с различными функциями. Так, CD4+ Т-лимфоциты могут стать Т хелперами 1 (Th1), 2 (Th2) и 17 (Th17) типов, а также Т-регуляторными клетками (Treg). Главные функции Т-хелперов заключаются в стимуляции CD8+ цитотоксических Т-лимфоцитов (ЦТЛ), способных специфически узнавать и уничтожать опухолевые клетки. Уникальная способность ДК заключается в активации CD4+ Т-хелперов и CD8+ ЦТЛ, и, таким образом, в определении направленности противоопухолевых иммунных реакций.

Преимущество адресных липосом для доставки НК в ДК заключается в возможности их использования непосредственно *in vivo* для активации

опухолеспецифических ЦТЛ на уровне организма. Представлялось интересным оценить способность адресных липосом серии МЛ активировать ЦТЛ *in vivo*. Для этого липоплексы 2Х3-DOPE/РНК-В16, М5/РНК-В16 и М6/РНК-В16 вводили внутривенно здоровым мышам линии С57Bl/6J и через 7 дней получали первичные культуры спленоцитов. Проводили их рестимуляцию лизатом клеток меланомы В16 и оценивали цитотоксичность против клеток меланомы В16 с помощью МТТ-теста (Рис. 3). Из рисунка видно, что интенсивность ЦТЛ ответа в случае липоплексов РНК с липосомами 2Х3-DOPE и М5, содержащих 5% мол. липоконъюгатов **2**, статистически значимо не отличалась от уровня лизиса под действием непраймированных спленоцитов (базовая линия, 7 – 10% клеток, Рис. 3). В случае использования липосом М6, содержащих 10% мол. липоконъюгатов **2**, наблюдался специфический лизис клеток меланомы В16, который был в 2.2 и 1.7 раз выше по сравнению с непраймированными спленоцитами и липосомами 2Х3-DOPE, соответственно (Рис. 3).

Таким образом, маннозо-содержащие адресные липосомы, демонстрируя примерно 1.1-1.5-кратный выигрыш в доставке РНК в ДК *in vitro* по сравнению с липосомами 2Х3-DOPE, имеют двукратный выигрыш в праймировании ЦТЛ на уровне организма.

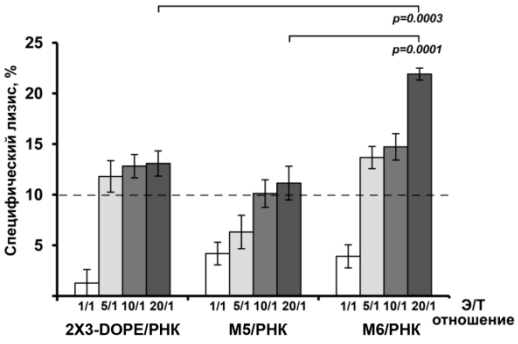


Рис. 3. Лизис клеток меланомы В16 под действием спленоцитов, праймированных липоплексами 2Х3-DOPE/РНК-В16, М5/РНК-В16 и М6/РНК-В16 *in vivo*. Базовая линия (пунктирная): неспецифический лизис клеток В16 спленоцитами, выделенными из контрольных животных, получавших инъекции Opti-MEM, Э/Т - эффекторные клетки (спленоциты) / таргетные клетки (клетки В16). Статистический анализ проводили с помощью т-теста Стьюдента. Данные представлены как MEAN±S.E.M.

5. Бесклеточные вакцины на основе комплексов липосом М6 с РНК

При введении ДК вакцин в организм-опухоленоситель праймирование ЦТЛ происходит путем непосредственного взаимодействия между ДК и Т-лимфоцитами с последующей пролиферацией опухолеспецифического клона ЦТЛ. При введении в организм-опухоленоситель липоплексов, содержащих опухолевую РНК, им необходимо сначала найти и трансфицировать ДК, которые, в свою очередь, далее будут праймировать ЦТЛ.

С целью сравнения эффективности праймирования ЦТЛ под действием липосом и ДК мышам трансплантировали клетки меланомы В16 и в/в вводили липоплексы 2Х3-DOPE/РНК-В16 или М6/РНК-В16, либо классические ДК-вакцины, где ДК были трансфицированы данными липоплексами *ex vivo*. Из

селезенки животных получали спленоциты и рестимулировали их клетками меланомы B16, обработанными митомицином С. Эффективность противоопухолевых ЦТЛ оценивали по способности уничтожать клетки меланомы B16 *in vitro* в режиме реального времени (Рис. 4).

Введение животным с меланомой как липоплексов, так и ДК-вакцин, инициировало активацию ЦТЛ (Рис. 4). Липоплексы М6/РНК активировали наиболее эффективные ЦТЛ, которые снижали количество клеток меланомы B16 в 2.7 раза относительно контроля через 60 ч совместной инкубации ЦТЛ с опухолевыми клетками (Рис. 4). Более того, эффективность липоплексов М6/РНК была сравнима с эффективностью ДК-вакцин, нагруженных комплексами такого же состава (Рис. 4). Липоплексы 2Х3-DOPE/РНК, как интактные так и в составе ДК-вакцины, были менее эффективны по сравнению с липоплексами и ДК-вакциной на основе липосом М6 (Рис. 4).

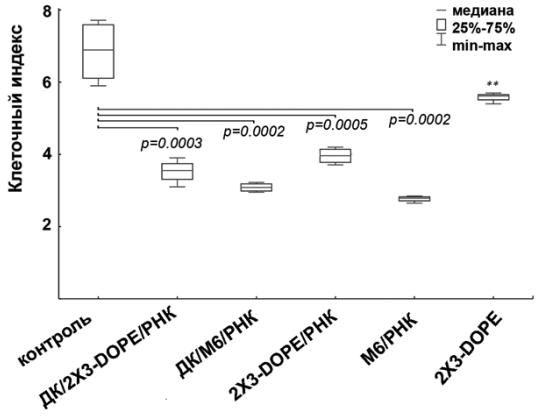


Рис. 4. Цитотоксическое действие спленоцитов мыши, индуцированных *in vivo* под действием ДК, нагруженных 2Х3-DOPE/РНК-B16 или М6/РНК-B16, и липоплексов того же состава, против клеток меланомы B16. Диаграмма, отражающая медианное значение клеточного индекса на время 60 ч. Статистическая обработка данных была проведена с помощью однофакторного дисперсионного анализа с апостериорным критерием Тьюки. ** - статистически недостоверные отличия по сравнению с контролем.

6. Противоопухолевый потенциал ДК, трансфицированных комплексами липосом серии N-DOPE и МЛ с опухолевой РНК

Одним из главных вопросов нашего исследования был вопрос, насколько ДК-вакцины, полученные путем трансфекции ДК липоплексами опухолевой РНК с липосомами N-DOPE и МЛ, эффективны в индукции противоопухолевого ответа *in vivo*. Для исследования противоопухолевого потенциала таких ДК использовали модель меланомы B16. Клетки меланомы B16 трансплантировали в/в мышам линии и на 4 день в/в однократно вводили ДК, нагруженные липоплексами 2Х3-DOPE/РНК-B16, 2D3-DOPE/РНК-B16 или Х2-DOPE/РНК-B16. Медианное количество метастазов в группе мышей, которым вводили ДК, нагруженные LF/РНК, составило 63, что в 1.3 раза ниже по сравнению с контролем, получавшим физ/раствор (медиана 84, Рис. 5). Введение животным ДК/2Х3-DOPE/РНК и ДК/2D3-DOPE/РНК привело к значительному снижению

количества метастазов (Рис. 5): медианное количество метастазов составило 25 и 22, соответственно, что в 3.3-3.8 раз меньше по сравнению с контрольной группой, и в 2.5-2.8 раза меньше по сравнению с группой животных, получавшей ДК/LF/РНК.

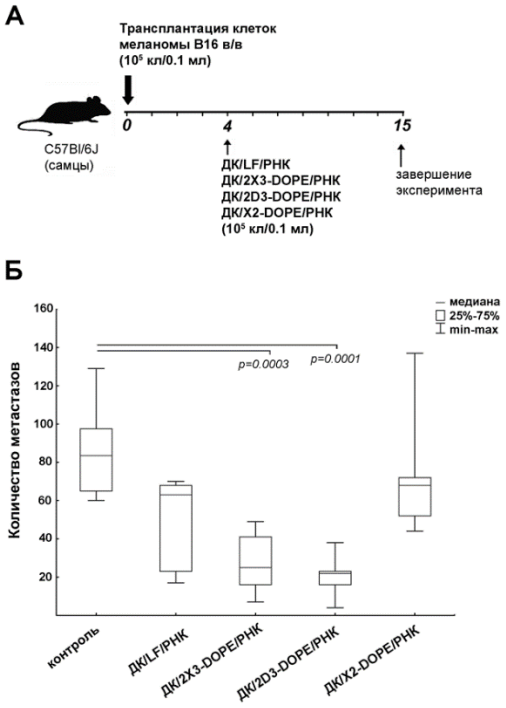


Рис. 5. Подавление метастазов на модели меланомы B16 с помощью ДК, трансфицированных липоплексами N-DOPE/ РНК-B16. **А.** Схема эксперимента. **Б.** Количество поверхностных метастазов в легких мышей с меланомой B16 после введения ДК, нагруженных липоплексами N-DOPE/РНК-B16. Диаграмма, отражающая медианное значение. Статистическую обработку данных проводили с использованием однофакторного дисперсионного анализа с апостериорным критерием Тьюки. Значение *p* отражает статистически достоверные отличия по сравнению с контролем.

Для исследования антиметастатической активности ДК, нагруженных липосомами серии МЛ в комплексе с опухолевой РНК, были выбраны липосомы 2X3-DOPE, M1, M2, M4, M5 или M6. Оказалось, что введение мышам с меланомой B16 ДК, трансфицированных липоплексами 2X3-DOPE/РНК, M5/РНК и M6/РНК, приводило к значительному снижению количества легочных метастазов (Рис. 6). Медианное количество метастазов в группах мышей, получавших ДК, нагруженные липоплексами 2X3-DOPE/РНК, составило 13 и было в 4.2 раза ниже по сравнению с контролем (Рис. 6). Липоплексы M5/РНК и M6/РНК более эффективно снижали количество метастазов: медианное количество составило 8 и 11, соответственно, что в 6.7 и 5 раз ниже по сравнению с контролем (Рис. 6). Для мышей, получавших инъекции ДК, трансфицированных липоплексами M4/РНК, медианное количество метастазов составило 18 и было в 3 раза ниже по сравнению с контролем (Рис. 6). Таким образом, из серии адресных липосом МЛ липосомы M5 и M6 являются лучшими кандидатами для приготовления опухолеспецифических ДК-вакцин *ex vivo*.

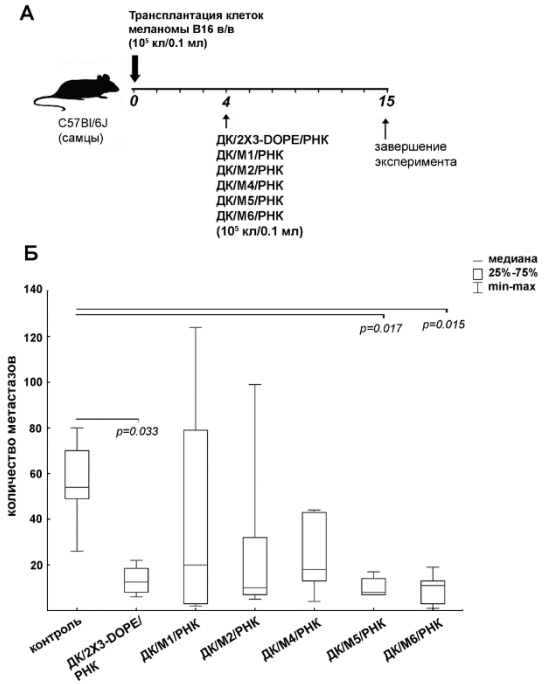


Рис. 6. Подавление метастазов на модели меланомы B16 с помощью ДК, трансфицированных липоплексами МЛ/ РНК-B16. **А**. Схема эксперимента. **Б.** Количество метастазов у животных с меланомой B16 после введения ДК, нагруженных липоплексами МЛ/РНК-B16. Диаграмма, отражающая медианное значение. Статистический анализ был проведен с помощью однофакторного дисперсионного анализа с апостериорным критерием Фишера. Значение p отражает статистически достоверные отличия по сравнению с контролем.

7. Сравнение противоопухолевой активности профилактической и терапевтической схем применения ДК на различных опухолевых моделях

ДК наиболее часто используют в противоопухолевой терапии в качестве терапевтических вакцин. Этот метод хорошо известен и широко используется для лечения диагностированных опухолей. ДК в качестве профилактических противоопухолевых вакцин исследуется, прежде всего, на мышиных опухолевых моделях. Использование профилактических вакцин необходимо в случае, когда наличие опухоли еще не установлено в организме пациента, однако, существует значительный риск ее развития.

В работе использовали три различные модели опухолевой прогрессии: Кребс-2, меланому B16 и LLC. Схема 1 отражает режим профилактической вакцинации (до трансплантации опухоли). В моделях опухолей Кребс-2 и LLC мыши были однократно в/в иммунизированы ДК-вакцинами за 7 дней до трансплантации опухоли. В модели меланомы B16 использовали первую ДК вакцинацию за две недели до трансплантации опухоли, ревакцинацию осуществляли через неделю. Схема 2 отражает режим терапевтического введения ДК вакцин. Животные-опухоленосители получали в/в инъекции ДК вакцин на 4 день после трансплантации опухоли, ревакцинацию мышей в модели меланомы B16 проводили на 11 день развития опухоли.

Эффективность противоопухолевого ответа при профилактической и терапевтической ДК вакцинации представлена на Рис. 7. В случае Кребс-2

профилактические вакцины как на основе РНК, так и на основе лизата не влияли на рост опухоли (Рис. 7, А). Введение терапевтической ДК вакцины на основе РНК (2/LF/РНК) мышам с Кребс-2 приводило к заметному (в 1.9 раз) подавлению роста опухоли по сравнению с контрольной группой, тогда как терапевтическая вакцина на основе лизата (2/лизат) была лишь слабо иммуногенной (Рис. 7, Б).

Поскольку на модели Кребс-2 ДК вакцины на основе суммарной опухолевой РНК обладали лучшим противоопухолевым действием, в экспериментах на модели LLC использовали ДК вакцины на основе РНК, а в качестве трансфектанта использовали Lipofectamine 2000 (LF) и катионные липосомы 2D3-DOPE. В группе животных, получавших профилактические ДК вакцины 1/2D3/РНК, наблюдалось двукратное снижение скорости роста опухоли по

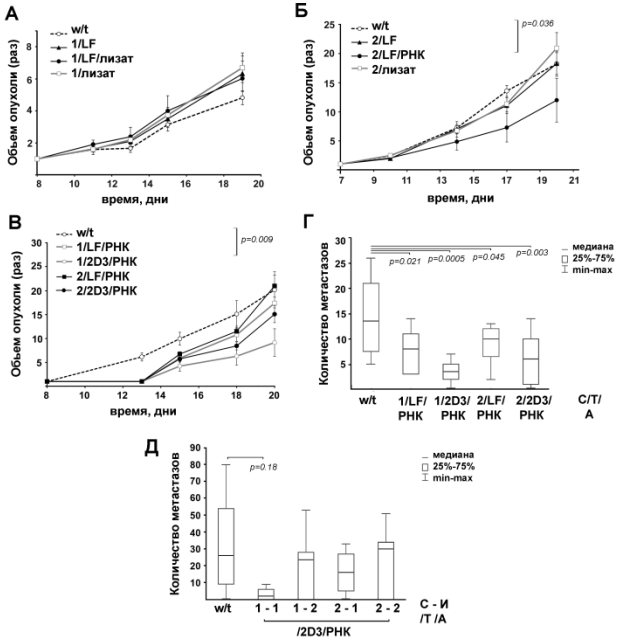


Рис. 7. Эффективность профилактических и терапевтических ДК вакцин. **А и Б.** Влияние ДК-вакцин на скорость роста первичной опухоли Кребс-2. w/t – контроль, животные с Кребс-2, получавшие физ/раствор. **В и Г.** Влияние ДК-вакцин на скорость роста первичной опухоли LLC и количество метастазов. w/t – контроль, животные с LLC, получавшие физ/раствор. Тип ДК вакцины для А-Г представлен в виде С/Т/А – схема (1 – профилактическая, 2 – терапевтическая)/трансфектант/источник антигена. **Д.** Влияние ДК-вакцин на количество метастазов на модели меланомы B16. Тип ДК вакцины представлен в виде С-И/Т/А – схема (1 – профилактическая, 2 – терапевтическая) – количество иммунизаций/трансфектант/источник антигена. w/t – контроль, животные с меланомой B16, получавшие физ/раствор. Статистический анализ был проведен с помощью однофакторного дисперсионного анализа с апостериорным критерием Фишера.

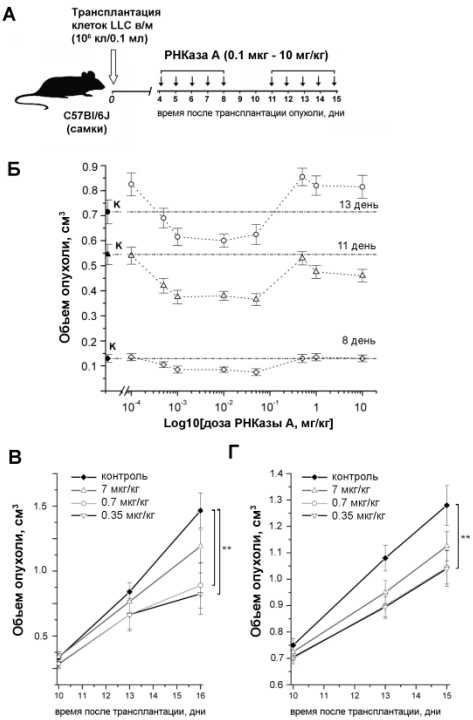
сравнению с контролем (Рис. 7, В). В этой же группе животных наблюдался и наиболее эффективный антиметастатический ответ – снижение количества легочных метастазов в 4.7 раз относительно контрольной группы (Рис. 7, Г). Терапевтическая вакцинация мышей-опухоленосителей такой же вакциной (2/2D3/РНК) приводила к 2.3-кратному снижению количества метастазов по сравнению с контролем (Рис. 7, Г), однако, не вызывала подавления роста первичной опухоли (Рис. 7, В). Применение как профилактических, так и терапевтических ДК вакцин с Lipofectamine 2000 не приводило к снижению скорости роста опухоли, однако вызывало 1.5-кратное снижение количества метастазов по сравнению с контролем (Рис. 7, Г).

На модели меланомы В16 использовали как одно-, так и двукратную вакцинацию ДК. В качестве ДК вакцин использовали ДК, трансфицированные липоплексами 2D3-DOPE/РНК-В16. Оказалось, что однократная профилактическая вакцинация 1-1/2D3/РНК наиболее эффективна и приводит к 10-кратному снижению количества легочных метастазов по сравнению с контролем (Рис. 7, Д). Двукратная профилактическая вакцинация приводила лишь к 1.5-2-кратному снижению числа метастазов (Рис. 7, Д), что свидетельствует о ее неэффективности. Было сделано предположение, что это может быть связано с поляризацией Т-хелперных ответов, которые не сдвигают иммунную систему в сторону надзора за опухолью.

8. Влияние РНКазы А и ДНКазы I на рост первичной опухоли и метастазирование

Оценку влияния РНКазы А и ДНКазы I на рост первичной опухоли проводили на модели LLC с первичным опухолевым узлом. РНКазу А (10^{-4}-10 мг/кг) и ДНКазу I (0.02-2.3 мг/кг) вводили в/м мышам с LLC, начиная с 4 дня после трансплантации, в течение 2 недель по схеме 5+2 (5 дней инъекции, 2 дня перерыв). На рис. 8 (Б) представлено изменение размеров опухолей в группах экспериментальных животных под действием РНКазы А. На 4 день введения РНКазы А в дозах 1 – 50 мкг/кг отмечалось подавление роста опухолей на 40 - 42 % по сравнению с контролем. К 11 дню торможение роста опухолей составляло 23 – 33 % по сравнению с контролем в группах мышей, получавших РНКазу А в дозах 0.5 – 50 мкг/кг, а к 13 дню размер опухолей в этих группах был на 16 % меньше, чем в контроле. В дозах свыше 1 мг/кг РНКаза А не вызывала торможения роста первичной опухоли. В группах животных, получавших ДНКазу I, не было отмечено достоверного подавления роста первичной опухоли.

Следующим этапом стало исследование противоопухолевой активности РНКазы А в наиболее эффективном диапазоне доз и ДНКазы I с использованием гепатомы НА-1, метастазирующей в печень. Опухоль LLC была использована нами в этом эксперименте в качестве положительного контроля торможения роста первичной опухоли под действием РНКазы А. На рис. 8 (В и Г) приведено влияние РНКазы А на скорость роста LLC и НА-1. Видно, что на 15 день после трансплантации опухоли в группах мышей с НА-1, получавших РНКазу А в



дозах 0.35 и 0.7 мкг/кг, наблюдалось торможение роста опухолей, которое составило 23% (Рис. 8, Г). В то же время торможение роста опухолей в соответствующих группах животных с LLC составило 43% по сравнению с контролем (Рис. 8, В). Так же, как и в случае модели LLC, в случае модели НА-1 ДНКаза I не оказывала влияния на первичную опухоль.

Влияние ферментов на метастазирование было исследовано при их применении как в режиме монотерапии на моделях LLC и НА-1, так и в режиме комбинированной терапии на модели LLC (Рис. 9, А). Мы обнаружили, что введение мышам с LLC ферментов в режиме монотерапии приводит к значительному снижению количества метастазов (Рис. 9, Б). Среднее количество метастазов

Рис. 8. Влияние РНКазы А на рост первичной опухоли. **А.** Схема эксперимента для модели LLC**.** Мышам с НА-1 вводили ферменты с 8 дня после трансплантации опухоли по той же схеме, что и для модели LLC. **Б.** Ингибирование роста LLC у мышей в зависимости от дозы РНКазы А**. В.** Кинетика ингибирования роста LLC у мышей под действием РНКазы А (0.35 - 0 7 мкг/кг). **Г.** Кинетика ингибирования роста НА-1 у мышей под действием РНКазы А (0.35 - 7 мкг/кг). Статистическую обработку данных проводили с использованием t-теста критерия Стьюдента. ** - $p < 0.05$

составило: 30±3, 13±4 и 18±3 в группах мышей, получавших РНКазу А в дозах 0.5, 0.7 и 10 мг/кг; 9±3 и 18±4 в группах мышей, получавших ДНКазу I в дозах 0.02 и 2.3 мг/кг, что было в 2 раза меньше по сравнению с контрольной группой. Методом морфометрии определяли индекс ингибирования метастазов (ИИМ). Во всех группах мышей с LLC или НА-1 введение ферментов приводило к снижению площади метастазов (Рис. 9, Б). В группах мышей с LLC, получавших ДНКазу I в дозах 0.02 и 2.3 мг/кг, ИИМ составил 45% и 36%, соответственно. В группах мышей с LLC, получавших РНКазу А, наиболее значительное ингибирование метастазов наблюдалось при дозах фермента 0.5 и 0.7 мкг/кг, в этом случае ИИМ составил 59% и 73% (Рис. 9, Б). Наиболее выраженный эффект наблюдался в группах мышей с LLC, получавших оба фермента: ИИМ составил 80% в группе мышей, получавших смесь 1, и достигал 95% в группе,

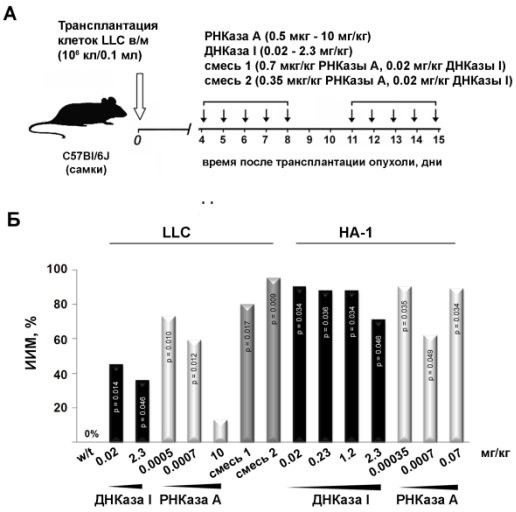


Рис. 9. Влияние РНКазы А и ДНКазы I на метастазирование на моделях LLC и HA-1 с первичным опухолевым узлом. **А.** Схема эксперимента для модели LLC**. Б.** ИИМ в группах мышей, получавших РНКазу А, ДНКазу I или смеси ферментов. ИИМ контрольной группы принимали за 0%, а ИИМ 100% отражал полное отсутствие метастазов. Для статистической обработки данных использовали t-тест критерия Стьюдента. Индекс ингибирования метастазов: ИИМ = $[(Š_к – Š_{эксп})/ Š_к]\times100\%$, где $Š_к$ – площадь метастазов в контроле, $Š_{экс}$ – площадь метастазов в эксперименте.

получавшей смесь 2 (Рис. 9, Б). В случае модели HA-1 ферменты вызывали более эффективное уменьшение площади метастазов по сравнению с моделью LLC (Рис. 9, Б): ИИМ варьировал от 62 до 90% в группах, получавших РНКазу А, и от 70 до 90% в группах, получавших ДНКазу I.

9. Подавление инвазивных свойств меланомы B16 *in vitro* и *in vivo* под действием ДНКазы I

Поскольку одной из важнейших характеристик инвазивного потенциала опухолевых клеток является миграционная активность, была проведена оценка влияния ДНКазы I на миграционную активность клеток меланомы B16 *in vitro* методом зарастания царапины (Рис. 10, А). Целостность сформированного клетками монослоя нарушали нанесением царапины и отслеживали скорость заполнения царапины опухолевыми клетками в отсутствие ДНКазы I (контроль) и в присутствии фермента (Рис. 10, А). Было выявлено, что ДНКаза I вызывает замедление миграции клеток: под ее действием наблюдается двукратное сокращение длины зоны миграции клеточного фронта (Рис. 10, А).

Для исследования *in vivo* мышам с меланомой B16 вводили ДНКазу I в дозах 0.12-1.2 мг/кг с 4 дня после траснплантации опухоли по схеме 5+2 (5 дней инъекции, 2 дня перерыв). Было показано, что ДНКаза I статистически достоверно снижает число метастазов на поверхности легких мышей с меланомой B16 во всех группах по сравнению с контролем (Рис. 10, Б). Медианное число метастатических центров в контрольной группе составило 115, а после применения ДНКазы I - 35-50 (Рис. 10, Б).

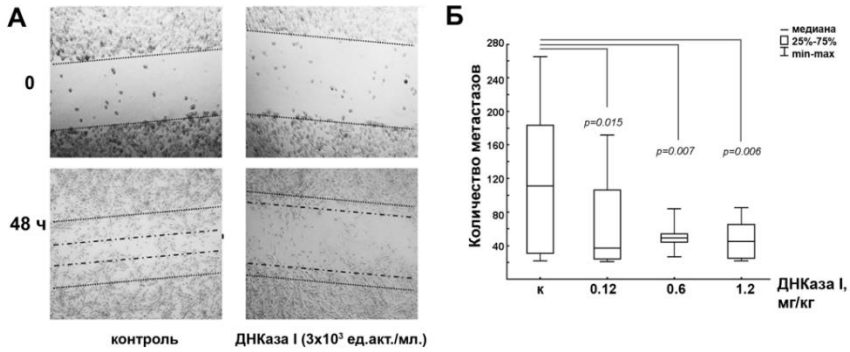


Рис. 10. Влияние ДНКазы I на меланому B16 *in vitro* (**А**) и *in vivo* (**Б**). **А.** Анализ миграционной активности клеток меланомы B16 под действием ДНКазы I (увеличение 4×). Прерывистой линией отмечены первоначальные границы царапины, пунктирной линией обозначены границы клеточного монослоя через 48 ч после нанесения повреждения. **Б.** Влияние ДНКазы I на количество поверхностных метастазов в легких мышей с меланомой B16. Статистическая обработка данных проведена с помощью однофакторного дисперсионного анализа с апостериорным критерием Тьюки.

10. Влияние каталитической функции РНКазы А и ДНКазы I на проявляемую ими противоопухолевую и антиметастатическую активность

Для того, чтобы оценить вклад каталитической активности РНКазы А и ДНКазы I в противоопухолевое и антиметастатическое действие ферментов, была исследована активность интактных и инактивированных РНКазы А и ДНКазы I на модели LLC по описанной схеме введения ферментов (Рис. 11). Для инактивации РНКазу А инкубировали в присутствие DEPC в условиях, обеспечивающих количественную модификацию остатков гистидина, находящихся в активном центре фермента, но не влияющих на структуру белка. После обработки DEPC РНКаза А полностью теряла способность расщеплять РНК. Для инактивации ДНКазы I фермент инкубировали при 65^0C в течение двух часов, и в результате каталитическая активность ДНКазы I снижалась в 10 раз. Оказалось, что инактивированная РНКаза А тормозит рост первичной опухоли в 2 раза менее эффективно, чем интактный фермент (Рис. 11, А). Инактивированная ДНКаза I, как и интактный белок, не оказывала влияния на первичную опухоль.

Инактивированные РНКаза А и ДНКаза I, тем не менее, вызывали снижение площади метастазов: в группе мышей, получавших инактивированную РНКазу А, ИИМ был в 1.3 раза меньше, чем в группе животных, получавших инъекции интактного фермента (Рис. 11 Б). Инактивированная ДНКаза I вызывала торможение метастазов в 1.7 раз менее эффективно, чем исходный белок. Полученные данные свидетельствуют о том, что каталитическая активность РНКазы А и ДНКазы I вносит существенный вклад в проявляемую этими ферментами антиметастатическую активность.

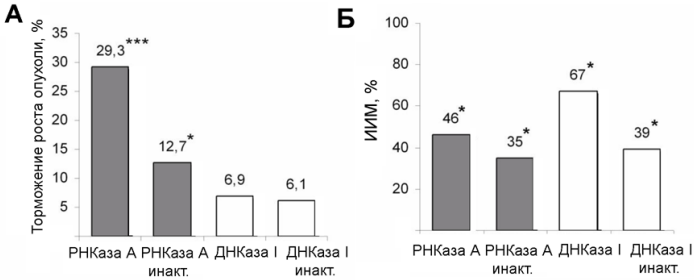


Рис. 11. Влияние каталитической функции РНКазы А и ДНКазы I на противоопухолевую и антиметастатическую активность. **А.** Торможение роста опухоли LLC в группах мышей, получавших РНКазу А (0.7 мкг/кг) и ДНКазу I (0.12 мг/кг) и инактивированные ферменты в тех же дозах с 4 дня после трансплантации опухоли. **Б.** ИИМ. Для статистической обработки данных использовали t-тест критерия Стьюдента. * - $p < 0.05$, *** - $p < 0.001$.

11. Исследование противоопухолевого и антиметастатического потенциала биназы на опухолевых моделях различного гистогенеза

Исследование противоопухолевого и антиметастатического потенциала биназы проводили совместно с коллегами из Института молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта РАН академиком Макаровым А.А., к.х.н. Митькевичем В. А. и к.ф.-м.н. Петрушанко И. Ю. В эксперименте использовали три опухолевые модели: LLC, лекарственно-устойчивую лимфосаркому RLS_{40} и меланому B16. Биназу вводили трижды в неделю в дозах 0.1 – 5 мг/кг, начиная с 4 дня после трансплантации опухолей. Обнаружилось, что введение биназы животным с LLC приводило к замедлению роста первичной опухоли на 35% (Таблица 4). Такой же эффект наблюдался в случае лимфосаркомы RLS_{40},

Таблица 4. Влияние биназы на первичную опухоль и метастазы.

Опухоль	Доза биназы, мг/кг*	Тип введения	Замедление роста опухоли, %	ИИМ, %
LLC	0.1	в/м	20	30*
	0.5		35**	51*
	1		20	47*
RLS_{40}	1	в/б	20**	50**
	5		20**	47**
B16	1	в/б	-	69**
	5		-	45

*Биназу вводили трижды в неделю в дозах 0.1 – 5 мг/кг с 4 дня после трансплантации опухоли. ИИМ – индекс ингибирования метастазов. Для статистической обработки данных использовали t-тест критерия Стьюдента. * - $p<0.001$, ** - $p<0.05$.

однако, замедление роста опухоли составило 20%, что, по всей вероятности, связано с ее лекарственной устойчивостью (Таблица 4). На всех трех опухолевых моделях биназа продемонстрировала заметный антиметастатический эффект. В группах мышей с LLC, получавших биназу, наблюдалось увеличение ИИМ в легких с возрастанием дозы биназы, и ИИМ

составил 30 - 47% (Таблица 4). Применение биназы на модели RLS_{40} приводило к подавлению метастазов в печени на 50%, и ИИМ был примерно одинаковым для всех доз (Таблица 4). Наиболее эффективный антиметастатический эффект биназа проявляла на модели меланомы B16: в дозе 1 мг/кг биназа приводила к подавлению метастазов на 69% (Таблица 4). Как и в случае лимфосаркомы RLS_{40} в случае меланомы B16 повышение дозы биназы до 5 мг/кг не приводило к потенциированию антиметастатического эффекта: ИИМ составил 45%.

12. Иммуномодулирующее действие ДК-вакцин, РНКазы А, ДНКазы I и биназы

Важным вопросом исследования был вопрос о возможности потенциирования противоопухолевого иммунного ответа под действием исследуемых ДК-вакцин и нуклеаз и отсутствии развития провоспалительного ответа. Для ответа на данный вопрос были исследованы следующие типы иммунного ответа: для ДК-вакцин - Т хелперный ответ 1 типа (Th1, цитокины ИЛ-12, ИЛ-2, ИФН-γ), Т хелперный ответ 2 типа (Th2, цитокины ИЛ-4, ИЛ-10, ИЛ-5), провоспалительный ответ (ИЛ-1β, ИЛ-6, ГМ-КСФ и ФНО-α), Т регуляторный ответ (уровень экспрессии *Foxp3* в спленоцитах); для нуклеаз - провоспалительный ответ (ИЛ-6 и ФНО-α), противоопухолевый ответ (ИФН-α и ИФН-γ).

Концентрации провоспалительных цитокинов (ИЛ-1β, ИЛ-6, ГМ-КСФ и ФНО-α) и цитокинов, характеризующих тип Т-хелперного ответа, определяли в сыворотке крови мышей с меланомой B16 после однократной в/в инъекции ДК. Оказалось, что введение ДК не индуцировало продукцию ни одного из провоспалительных цитокинов. Также было показано, что уровень экспрессии *Foxp3* не менялся в спленоцитах животных-опухоленосителей с меланомой B16 после введения ДК, что указывает на отсутствие индукции Т-регуляторных клеток. Исследование поляризации Th1-ответа в тех же группах показало, что для групп M1, M2, M4, M5 и M6 наблюдается повышение уровня ИЛ-12 в 1.2 – 2.2 раза, а для групп 2X3-DOPE, M1, M2, M4 и M5 – повышение уровня ИЛ-2 в 1.5 – 14 раз (Таблица 5). Ни для одной из липосомальных композиций не было выявлено изменения уровня ИФН-γ. В случае цитокинов, специфических для Th2 ответа, для групп 2X3- DOPE, M2 и M4 наблюдалось повышение уровня ИЛ-4 в 50 – 100 раз, для группы M2 – повышение уровня ИЛ-5 в 1.7 раз (Таблица 5). Изменения уровня ИЛ-10 выявлено не было. Таким образом, для ДК, нагруженных липоплексами M1, M4 и M5, характерна поляризация Т-хелперного ответа 1 типа, тогда как для ДК, нагруженных липоплексами M2 –Т-хелперного ответа как 1 так и 2 типа. Исследуемые ДК-вакцины наряду с наблюдаемым противоопухолевым и антиметастатическим действием характеризовались *in vivo* отсутствием активации провоспалительного ответа и поляризацией как Th1, так и Th2 типов Т-хелперного ответа со сдвигом равновесия Th1 > Th2.

Для выявления иммуномодулирующего эффекта РНКазы А и биназы были определены уровни ИФН-α и ИФН-γ, играющих ключевую роль в противоопухолевом иммунном ответе, и уровни провоспалительных цитокинов

ИЛ-6 и ФНО-α. Было обнаружено, что ни РНКаза А, ни биназа не оказывают влияния на уровень ИФН-α. РНКаза А приводила к повышению

Таблица 5. Изменение уровня цитокинов Th-ответа в крови мышей с меланомой B16 после введения ДК-вакцин.

Тип ДК-вакцины	Th1*			Th2*		
	ИЛ-12	ИЛ-2	ИФН-γ	ИЛ-4	ИЛ-10	ИЛ-5
2X3	□	8↑	□	70↑	□	□
M1	2↑	6↑	□	5↑	□	2↓
M2	2↑	6↑	□	50↑	□	2↑
M4	1.2↑	14↑	□	100↑	□	□
M5	1.2↑	1.5↑	□		□	2↑
M6	2.2↑	□	□		□	□

* - изменение уровня цитокинов относительно контроля (в разах); □ - уровень цитокина не менялся. Цитокины определяли в сыворотке крови животных с меланомой B16 после введения ДК, нагруженных липоплексами МЛ/РНК-B16, с помощью иммуноферментного анализа (ELISA). Уровень цитокинов в крови мышей с меланомой B16, не получавших ДК, был использован в качестве контроля.

уровня ИФН-γ в 2 раза и снижала уровень ФНО-α в 2 раза по сравнению с контролем (Таблица 6). Биназа на всех опухолевых моделях повышала уровень ИФН-γ от 3 до 20 раз и на модели меланомы B16 снижала уровень ИЛ-6 в 4.5 раза (Таблица 6).

Таблица 6. Изменение уровня цитокинов в крови мышей-опухоленосителей под действием нуклеаз.

Опухолевая модель	Нуклеаза	ИФН-γ	ФНО-α	ИЛ-6
LLC[а]	РНКаза А	2↑	2↓	□
LLC[б]	биназа	3↑	□	□
RLS_{40}[в]		20↑	□	□
B16[г]		3↑	□	4.5↓

* - изменение уровня цитокинов относительно контроля (в разах); □ - уровень цитокина не менялся. Уровень цитокинов в сыворотке крови животных: [а] - с LLC, получавших РНКазу А (0.7 мкг/кг); [б, в, г] – с LLC, RLS_{40} или B16, получавших биназу (1 мг/кг). Уровень цитокинов определяли с помощью иммуноферментного анализа (ELISA). Уровень цитокинов в крови мышей-опухоленосителей, не получавших нуклеазы, был использован в качестве контроля.

Поскольку исследуемые нами нуклеазы являются для организма мыши чужеродными белками и способны вызывать неспецифическую антигенную стимуляцию в организме, необходимым являлось оценить состояние органов иммунной системы, что было выполнено на примере ДНКазы I. После введения мышам с меланомой B16 ДНКазы I (1.2 мг/кг) в селезенке и тимусе обнаружили признаки значительной антигенной стимуляции: увеличение объемной плотности белой пульпы и диаметра лимфоидных фолликулов в селезенке в 2 и 1.9 раз по сравнению с контрольными животными, соответственно; увеличение

объемной плотности коркового вещества в тимусе в 1.2 раза и корково-мозгового индекса в 3 раза. Наблюдаемая неспецифическая антигенная стимуляция под действим ДНКазы I может вносить вклад в антиметастатический эффект за счет повышения функционирования компонентов иммунной системы, находящихся в состоянии супрессии при прогрессировании опухоли.

13. Исследование механизма противоопухолевого и антиметастатического действия РНКазы А: поиск молекулярных мишеней среди регуляторных РНК

Стабильное изменение уровня циркулирующих НК в настоящее время является надежным и чувствительным показателем системной опухолевой прогрессии. Высокая рибонуклеазная активность РНКазы А позволила предположить, что антиметастатическое действие фермента может быть связано с влиянием на метаболизм нуклеиновых кислот у животных-опухоленосителей. Принимая во внимание высокую рибонуклеазную активность РНКазы А и тот факт, что согласно литературным данным РНКаза А не оказывает прямого цитотоксического действия на опухолевые клетки путем расщепления внутриклеточных РНК из-за ее инактивации под действием цитозольного рибонуклеазного ингибитора, нами было сделано предположение, что фермент оказывает влияние на регуляторные пути канцерогенеза и сигнальные каскады, ответственные за опухолевую прогрессию.

Мы проанализировали концентрацию внРНК и эффективные константы скорости расщепления РНК в плазме крови здоровых мышей, мышей с LLC, получавших физ/раствор (контроль), и мышей с LLC, получавших РНКазу А (0.7 мкг/кг). Наши данные показали, что концентрация внРНК в плазме крови здоровых мышей C57Bl/6J составляет 54 нг/мл при РНКазной активности $(4.9\pm0.6)\times10^{-4}$ сек$^{-1}$. В процессе развития LLC у мышей C57Bl/6J происходило увеличение концентрации внРНК до 240 нг/мг (в 4.5 раза по сравнению со здоровыми животными) и падение РНКазной активности до $(3.6\pm0.5)\times10^{-4}$ сек$^{-1}$ (в 1.4 раза). Введение мышам с LLC РНКазы А не приводило к достоверному снижению концентрации внРНК в плазме, тем не менее, было отмечено повышение РНКазной активности до $(4.1\pm0.5)\times10^{-4}$ сек$^{-1}$. Было сделано предположение, что РНКаза А не столько снижает уровень циркулирующих внРНК, сколько влияет на перераспределение репертуара РНК.

С целью поиска молекулярных мишеней РНКазы А было исследовано изменение профилей миРНК в опухолевой ткани и сыворотке крови мышей с LLC после введения фермента, а с целью поиска мишеней РНКазы А среди кодирующих РНК - изменение транскриптома опухоли после воздействия РНКазы А. Схема эксперимента представлена на Рис. 12. В результате были получены следующие фракции: фракции опухолеспецифических РНК – (1) фракция высокомолекулярных РНК из опухолевой ткани контрольных мышей, получавших физ/раствор (RNA_{LTc}); (2) фракция высокомолекулярных РНК из опухолевой ткани мышей, получавших РНКазу А (RNA_{LTR}); (3) фракция

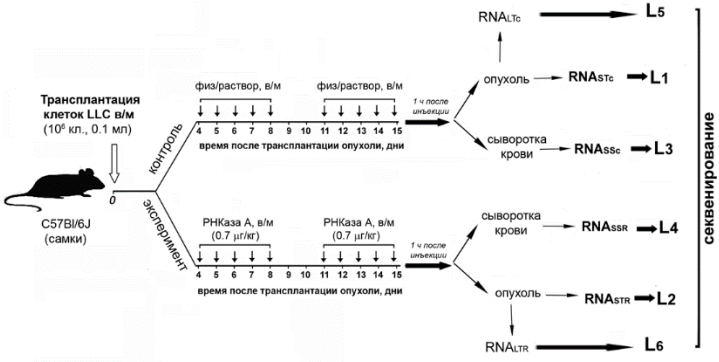


Рис. 12. Схема эксперимента для приготовления кДНК-библиотек. Мыши с LLC получали в/м инъекции физ/раствора или РНКазы А (0.7 мкг/кг) в течение 10 дней, начиная с 4 дня после трансплантации опухоли. Через час после последней инъекции образцы опухоли и крови собирали, получали первичные культуры и сыворотку и объединяли согласно группам. Фракции высокомолекулярных и низкомолекулярных РНК выделяли из опухолевых клеток и сыворотки и использовали для конструирования кДНК-библиотек. Библиотеки L1-L4 секвенировали на платформе SOLiD 3.5, библиотеки L5 и L6 – на платформе SOLiD 5.5.

низкомолекулярных РНК из опухолевой ткани контрольных мышей, получавших физ/раствор (RNA_{STc}); (4) фракция низкомолекулярных РНК из опухолевой ткани мышей, получавших РНКазу А (RNA_{STR}); фракции сывороточных РНК – (5) фракция низкомолекулярных РНК из опухолевой ткани контрольных мышей, получавших физ/раствор (RNA_{SSc}); (6) фракция низкомолекулярных РНК из опухолевой ткани мышей, получавших РНКазу А (RNA_{SSR}). Фракции опухолеспецифических низкомолекулярных РНК RNA_{STc} и RNA_{STR}, а также фракции сывороточных низкомолекулярных РНК RNA_{SSc} и RNA_{SSR}, были использованы для приготовления кДНК-библиотек L1-L4 (Рис. 12). Библиотеки L1-L4 были секвенированы на платформе SOLiD ABA 3.5.

Анализ данных секвенирования показал, что РНКаза А приводит к изменению уровней 123 из 615 опухолеспецифических миРНК и 139 из 617 циркулирующих миРНК сыворотки крови. Как и ожидалось, РНКаза А приводит к снижению уровня подавляющего большинства сывороточных миРНК: было обнаружено значительное снижение уровня 137 миРНК и повышение уровня 2 миРНК. Однако в опухолевой ткани под действием РНКазы А были отмечены противоположные изменения: было обнаружено повышение уровня 116 опухолеспецифических миРНК и снижение уровня только 7 миРНК.

Отбор ключевых миРНК, изменившихся после воздействия РНКазы А проводили с учетом трех критериев: (1) содержания миРНК в опухоли и сыворотке; (2) эффективности повышения/снижения уровня миРНК после воздействия РНКазы А; (3) важности миРНК для регуляции канцерогенеза. На основании этих критериев были выбраны девять миРНК, как онкомиров, так и

онкосупрессоров: *mir-29b*, *mir-21*, *mir-10b*, *mir-451a*, *mir-17*, *mir-18a*, *mir-145*, *mir-31* и *let-7g*. Представленность опухолеспецифических и сывороточных миРНК по данным секвенирования, а также миРНК семейства *let-7*, qПЦР, приведена в логарифмических координатах на Рис. 13. Параллельно уровень миРНК был оценен с помощью qПЦР (Таблица 7). Уровень *mir-10b*, *mir-451a* и *mir-145* был повышен в сыворотке крови по сравнению с опухолью, тогда как уровень *mir-20b*, *mir-21*, *mir-17*, *mir-18a* и *mir-31* был повышен в опухоли по сравнению с сывороткой крови (Рис. 13, А) у мышей с LLC, получавших физ/раствор (контроль). Из миРНК, принадлежащих к миРНК семейства *let-7*, только *let-7d* преобладала в сыворотке крови по сравнению с опухолью у мышей контрольной группы (Рис. 13, Б). В опухолевой ткани мышей с LLC, получавших РНКазу А, происходило повышение уровня

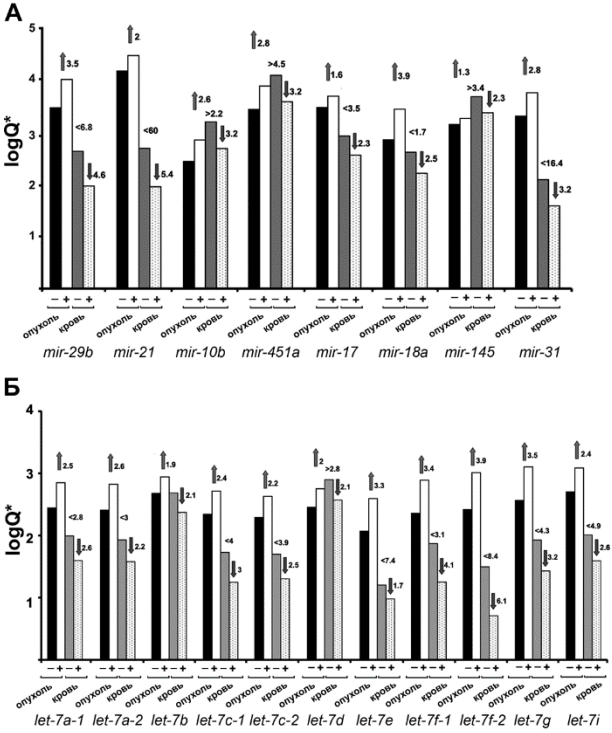


Рис. 13. Представленность миРНК по данным секвенирования. **А.** Изменение уровней миРНК в опухоли и сыворотке крови после воздействия РНКазы А. **Б.** Изменение миРНК семейства let-7 в опухоли и сыворотке крови после воздействия РНКазы А. Q - RPKM, количество фрагмент-специфичных прочтений на 1000 нк на млн прочтений в библиотеке. «-» – мыши с LLC, получавшие инъекции физ/раствора; «+» - мыши с LLC, получавшие инъекции РНКазы А.

экспрессии выбранных миРНК, которое составило от 1.6 до 3.9 раз (Рис. 13, А, Таблица 7). Наиболее значительное повышение уровня экспрессии миРНК после воздействия РНКазы А было отмечено для *mir-18a* (3.9 раз), *mir-29b* (3.5 раза), *mir-31* (2.8 раз, Рис. 13, А) и *let-7g* (3.5 раза, Рис. 13, Б, Таблица 7). Следует отметить, что уровень экспрессии всех миРНК семейства *let-7*, принадлежащих к опухолевым супрессорам, значительно повышался в опухоли после воздействия

Таблица 7. Сравнение изменения уровня миРНК в опухоли и сыворотке крови мышей с LLC под действием РНКазы А по данным qПЦР и данным секвенирования.

миРНК	**Секвенирование*** **(опухоль/кровь)**	**qПЦР *in vivo**** **(опухоль/кровь)**
mir-29b	3.5↑ / 4.6↓	1.3↑ / 3.3↓
mir-21	2.0↑ / 5.4↓	1.3↑ / 3.3↓
mir-10b	2.6↑ / 3.2↓	1.8↑ / 2.2↓
mir-451a	2.8↑ / 3.2↓	2.2↑ / 2.0↓
mir-17	3.5↑ / 4.6↓	2.2↑ / -
mir-18a	3.9↑ / 2.5↓	1.7↑ / -
mir-145	1.3↑ / 2.3↓	1.7↑ / 1.7↓
mir-31	2.8↑ / 3.2↓	1.9↑ / 2.5↓
let-7g	3.5↑ / 3.2↓	1.8↑ / 2.0↓

РНКазы А (Рис. 13, Б).

В сыворотке крови РНКаза А вызывала снижение уровня всех выбранных миРНК, которое составило от 1.7 до 6.1 раз. Наиболее значительное снижение уровней миРНК в сыворотке крови мышей, получавших РНКазу А, было отмечено для *let-7f-2* (6.1 раз), *mir-21* (5.4 раза), *mir-29b* (4.6 раза) и *let-7f-1* (4.1 раз, Рис. 13, Таблица 7).

Влияние РНКазы А на уровень экспрессии миРНК в опухолевых клетках было необходимо исследовать *in vitro*, для того, чтобы понять, является ли эффект системным на уровне организма, или на уровне клетки. Одним из вопросов исследования было выяснение важности каталитической активности РНКазы А для проявляемого ею эффекта воздействия на регуляторные миРНК. Для ответа на поставленные вопрос был проведен эксперимент с первичной культурой клеток LLC, подвергнутых воздействию РНКазы А или РНКазы А, инактивированной DEPC, в концентрациях, в которых был получен эффект *in vivo*. Исследование показало, что инкубация клеток LLC в присутствии интактной РНКазы А приводила к 2-3-кратному повышению уровня экспрессии миРНК (Рис. 14). Наиболее значительно повышались уровни экспрессии *mir-31* (2.8 раз), *mir-17* (2.6 раз), *let-7g* (2.5 раз) и *mir-21* (2.5 раз, Рис. 14). Инактивированная РНКаза А вызывала незначительное повышение уровня экспрессии некоторых миРНК, однако, это повышение не было статистически достоверным (Рис. 14). Таким образом, было показано, что повышение экспрессии миРНК в опухоли является результатом воздействия РНКазы А, и рибонуклеазная активность фермента является для этого необходимым условием.

Также была проанализирована экспрессия мРНК генов, кодирующих ключевые белки, ответственные за процессинг миРНК: *RNASEN (Drosha), xpo5, dicer1* и *eif2c2 (Ago2)*. Анализ их экспрессии с помощью qПЦР показал, что уровень мРНК этих генов повышался в опухоли в ответ на введение интактной РНКазы А, при этом инактивированная РНКаза А не оказывала никакого влияния на компоненты биогенеза миРНК.

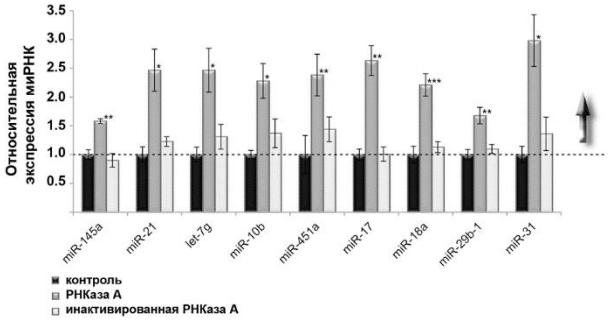


Рис. 14. Уровень экспрессии миРНК в клетках LLC, инкубированных *in vitro* с РНКазой А и инактивированным ферментом, в течение 48 ч. В качестве референсных генов использовали *U6* и *rpl30*. Для статистической обработки данных использовали t-тест критерия Стьюдента. * - p=0.05, ** - p=0.01 и *** - p=0.001.

14. Поиск молекулярных мишеней РНКазы А среди кодирующих РНК.

Для анализа изменений в опухолевой клетке под действием РНКазы А библиотеки L5 и L6 (Рис. 12), полученные на основе фракций высокомолекулярных РНК из ткани опухоли мышей с LLC, получавших физ/раствор (L5) или РНКазу А (L6), были секвенированы на платформе SOLiD^{TM} ABA 5.5. Гены были картированы на референсный геном *Mus musculus* (версия NCBI37). Анализ дифференциальной экспрессии выявил 966 дифференциально экспрессирующихся транскриптов, уровень 322 из которых был повышен, а 644 – понижен в опухолевой ткани группы мышей с LLC, получавших РНКазу А (библиотека L6), по сравнению с группой мышей с LLC, получавших физ/раствор (контроль, библиотека L5).

С использованием анализа Gene Ontology (биологических процессов [BP], молекулярных функций [MF] и клеточных компонентов [CC]), нами было обнаружено, что в терминах BP наиболее существенные изменения в экспрессии наблюдались для генов, вовлеченных в метаболические и клеточные процессы (GO:0008152 и GO:0009987), регуляцию биологических процессов (GO:0065007) и ответ на стимулы (GO:0050896). В терминах MF наиболее подверженными изменению процессами были каталитическая активность (GO:0003824) и связывание (GO:0005488). В терминах CC наибольшие изменения наблюдались для клеточных компонентов (GO:0044464) и органелл (GO:0043226).

Для наложения данных секвенирования на метаболические пути, важные для опухолевой прогрессии, и регуляторные пути, задействованные в неконтролируемой пролиферации клеток и злокачественной трансформации, были использованы интернет-ресурсы KEGG Automatic Annotation Server и Gene Card. С помощью данного подхода были идентифицированы опухолевые индукторы и супрессоры, миРНК-ассоциированные гены, активаторы, репрессоры и регуляторы транскрипции, а также транскрипционные факторы (Таблица 8). При анализе принимали во внимание количество генов с повышенной и пониженной экспрессией в библиотеке L6 по сравнению с библиотекой L5 и их вовлечение в регуляторные пути, важные для

выживаемости опухолевой клетки.

Было обнаружено, что после воздействия РНКазы А на опухоль *in vivo* происходит изменение экспрессии генов, вовлеченных в метаболические пути (25.1%); события, связанные с опухолевой прогрессией (ответственные за клеточный цикл, модуляцию опухолевого микроокружения, компоненты внеклеточного матрикса, 17.9%); регуляторные пути, ответственные за клеточную пролиферацию и злокачественную трансформацию (25.4%); регуляцию транскрипции (23.5%); опухолевые индукторы и супрессоры (6.2%), а также гены, участвующие в биогенезе миРНК (1.6%) (Таблица 8).

Метаболические пути и каскады. Наиболее существенные изменения экспрессии генов наблюдались для следующих метаболических путей: метаболизм аминосахаров и нуклеотидных сахаров, метаболизм аминокислот и нуклеотидов (↑ (повышение уровня) 4 генов, ↓ (снижение уровня) 8 генов); метаболизм углеводов (↑9 генов, ↓8 генов); метаболизм жирных кислот и липидов (↑11 генов, ↓7 генов, Таблица 8). Окислительное фосфорилирование (↑6 генов, ↓3 генов) и метаболизм инозитол фосфата (↑5 генов, ↓1 гена) также подвергались изменениям после воздействия РНКазы А (Таблица 8). Среди ключевых компонентов метаболизма инозитол фосфата было отмечено повышение уровня гена *Impa 1*, кодирующего инозитол(мио)-1(или 4)-монофосфатазу 1. Этот фермент дефосфорилирует мио-инозитол монофосфат с образованием свободного мио-инозитола, предшественника фосфатидилинозитола, и, таким образом, является важным модулятором внутриклеточной передачи сигнала.

События, связанные с опухолевой прогрессией. Среди таких событий, которые связаны с прогрессией опухоли, ее диссеминацией и выживаемостью, было обнаружено изменение в экспрессии генов, вовлеченных в ангиогенез (↑2 генов, ↓4 генов), апоптоз (↑8 генов, ↓12 генов), а также контроль клеточного цикла и трансформацию (↑4 генов, ↓5 генов, Таблица 8). Событиями, претерпевшими наибольшие изменения после воздействия РНКазы А, были клеточная адгезия, миграция и инвазия (↑8 генов, ↓12 генов, Таблица 8). Среди 8 генов с повышенным уровнем экспрессии, вовлеченных в адгезию, было обнаружено 3 гена, участвующих в позитивной регуляции клеточной адгезии и негативной регуляции диссеминации опухоли (*Ptpn14*, *Myl12b* и *Emp2*) (Таблица 8). Среди генов с пониженным уровнем экспрессии был выявлен *Smoc2*, содействующий пролиферации и миграции. Среди генов с повышенной экспрессией, вовлеченных в апоптоз, было обнаружено 5 генов, кодирующих белки, которые функционируют, как позитивные индукторы апоптоза, как по каспазному, так и по митохондриальному пути (*Pcpb4*, *Faim*, *Pycard*, *Plekhf1* и *Dapk1*). Среди генов с пониженной экспрессией, вовлеченных в апоптоз, было выявлено два гена, кодирующих негативные регуляторы апоптоза (*Hipk3* и *Bcl2l2*).

Сигнальные пути, регулирующие опухолевую прогрессию. Воздействие РНКазы А на опухоль приводило к негативной регуляции некоторых сигнальных

Таблица 8. События и сигнальные пути, наиболее изменившиеся при снижении инвазивного потенциала LLC под действием РНКазы А.

Событие или сигнальный путь	**Гены с повышенным уровнем экспрессии**	**Гены с пониженным уровнем экспрессии**	**p-value**[a]
Метаболические пути			
Метаболизм аминосахаров и нуклеотидных сахаров, метаболизм аминокислот и нуклеотидов	**4:** *Uap1l1, Mtap, Cant1, Impdh2*	**8:** *Nos2, Dguok, Adprm, Twistnb, Setdb2, Hal, Amdhd1, Gnpnat1*	9.373E-4
Метаболизм углеводов	**9:** *Pgls, Gaa, Bpgm, Mcee, B4galt2, Xylb, Pdk4, Aldoc, Lalba*	**8:** *Eno3, Galnt3, Alg10b, Csgalnact2, Alg6, Ndst2, Gxylt1, Xylt1*	1.427E-13
P450-опосредованный метаболизм	**1:** *Akr7a5*	**3:** *Hsd11b1, Cyp27b1, Cyp26b1*	2.075E-4
Метаболизм инозитол фосфата	**5:** *Impa1, Gpaa1, Ip6k2, Plcd1, Pigb*	**1:** *Pi4k2b*	
Метаболизм жирных кислот и липидов	**11:** *Ech1, Hadh, Eci2, Acadvl, Pld3, Cbr4, Acat2, Phospho1, Plcxd2, Acsbg1, St3gal5*	**7:** *Agpat2, Cd5l, Mcat, Elovl6, Lipt1, B4galt6, B3galnt1*	2.848E-11
Окислительное фосфорилирование	**6:** *Ndufv3, Cox8a, Foxred1, Ndufb11, Bcs1l, Cox18*	**3:** *Cox7b, Ndufa5, Atp8b4*	7.042E-9
Метаболизм никотината и никотинамида	**2:** *Nmnat3, Art5*	**1:** *Bst1*	5.239E-6
Метаболизм глутатиона	**2:** *Chac1, Haghl*	**3:** *Gclm, Gss, Gpx7*	2.322E-7
События, важные для опухолевой прогрессии			
Ангиогенез	**2:** *Adamts10, Robo4*	**4:** *Cxcl5, Filip1l, Smoc2, Angptl1*	-[b]
Апоптоз	**8:** *Pcbp4, Steap3, Ctsh, Faim, Pycard, Plekhf1, Nol3, Dapk1*	**12:** *Lcn2, Ctsc, Gzmb, Hipk3, Phlda1, Bcl2l2, Casp9, Ctso, Casp12, Coro2a*	4.643E-9
Клеточная адгезия, миграция и инвазия	**8:** *Rap2a, Myl12b, Emp2, Ptpn14, Bcas3, Abi3, Ajap1, Jup*	**12:** *S100a4, Col1a1, Cav2, Rab1, Thbs1, Rasgrf1, Shc4, Lrg1, Cxcl5, Itga7, Smoc2, Ccnd2*	1.024E-11
Контроль клеточного цикла, трансформация	**4:** *Usp10, Mad2l2, Cdc26, Rnf122*	**5:** *S100a9, Nedd8, Incenp, Cenpw, Nudt6*	2.000E-3
Сигнальные пути, участвующие в злокачественной трансформации			
PI3K/AKT	**3:** *Angpt2, Il2rb, Hsp90aa1*	**12:** *Col1a1, Thbs1, Il4ra, Csf3, Jak2, Tnc, Jak3, Itga7, Csf3r, Il7r, Ccnd2, Itga4*	2.827E-24
RAS	**4:** *Rras, Grap, Angpt2, Rgs14*	**4:** *Rasgrf1, Kras, Shc4, Pld1*	9.345E-10
MAPK	**6:** *Rras, Trib3, Map3k6, Hspa1b, Lamtor1, Dok4*	**11:** Ccl7, Dusp6, Il1b, Cd14, *Rasgrf1, Stk24, Il1r2, Ccl5, Map2k4, Hspa2, Itgax*	1.869E-13
TGF-β	**2:** *Fam89b, Fmod*	**6:** *Ccl7, Thbs1, Ccl5, Acvr1b, Rbx1, Fst*	2.863E-8

Таблица 8 (продолжение).

Событие или сигнальный путь	**Гены с повышенным уровнем экспрессии**[a]	**Гены с пониженным уровнем экспрессии**[б]	
Wnt	**5:** *Serpinf1, Wnt8a, Vangl1, Bcl9, Shisa2*	**7:** *Chd8, Lrrfip2, Dkk2, Hmgxb4, Rbx1, Lgr4, Ccnd2*	8.037E-13
JAK-STAT	**2**: *Il12rb1, Il2rb*	**11:** *Ccl7, Il4ra, Shcbp1, Ccl5, Csf3, Jak2, Jak3, Csf3r, Il21r, Il7r, Ccnd2*	4.607E-18
Кальциевый сигнальный путь	**3:** *Tnnc2, Camk2g, Tnnc1*	**2:** *P2rx7, Tnc*	
Процессинг миРНК	-	**5**: *Ezh2, Lin28a, Zcchc6, Tnrc6a, Zcchc11*	8.498E-7
Опухоль-ассоциированные гены	-	**12:** *Orai1, Dpp3, Arhgef1, Steap1, Arhgef11, Skp2, Tpd52, Mllt11, Laptm4b, Rfng, Ehbp1, Rbm6*	-[b]
Опухолевые супрессоры	**3:** *Cyb561d2, Trit1, Pdgfrl*	**4**: *Armcx1, Brca2, Tssc1, Scai*	-[b]

[a]p-value рассчитывали с помощью инструмента для аннотации транскриптома ToppFun (https://toppgene.cchmc.org); [b]гены, принадлежность которых к биологическим процессам была найдена с помощью базы данных Gene Card. Гены, уровень экспрессии которых в опухоли мышей с LLC после применения РНКазы А изменился более чем в 1.4 раз, были распределены в метаболические и сигнальные пути на основании аннотации с помощью базы данных KEGG и анализа с помощью базы данных Gene Card.

путей, напрямую участвующих в опухолевой прогрессии: PI3K/AKT (↑3 генов, ↓12 генов), TGF-β (↑2 генов, ↓6 генов), JAK/STAT (↑2 генов, ↓11 генов) и канонический WNT путь (↑6 генов, ↓11 генов, Таблица 8). Из генов, ассоциированных с путем TGF-β, следует отметить значительное повышение уровня экспрессии гена *Fam89b*, являющегося супрессором пути TGF-β. Некоторые изменения также были отмечены для MAPK пути (↑6, ↓11 генов), а также пути RAS и сигнального кальциевого пути (Таблица 8).

С целью валидации данных секвенирования была исследована экспрессия генов в ткани опухоли мышей с LLC после применения РНКазы А с помощью qПЦР. Для этого брали гены, вовлеченные в различные сигнальные пути: *Mtap* (метаболизм аминосахаров, нуклеотидных сахаров, аминокислот и нуклеотидов); *Angptl4* (ангиогенез); *Fam89b* (негативный регулятор сигнального пути TGF-β); *Serpinf1* (сигнальный путь Wnt); *Dusp6* и *Map2k4* (сигнальный путь MAPK). Было обнаружено, что уровни экспрессии генов *Dusp6* и *Map2k4* после применения РНКазы А снижались в 1.3 и 1.5 раз, соответственно (Рис. 15), что коррелирует с данными секвенирования (Таблица 8). Уровень экспрессии генов *Mtap*, *Fam89b*, *Serpinf1* и *Angptl4* под действием РНКазы А повышались в 1.6, 1.7, 1.3 и 2.5 раз, соответственно (Рис. 15), что также коррелирует с данными секвенирования (Таблица 8).

Предполагаемый механизм противоопухолевого действия РНКазы А представлен на Рис. 16. Мы предполагаем, что после попадания РНКазы А в кровь после внутримышечной инъекции, ее главными мишенями оказываются циркулирующие внРНК, включая полный набор некодирующих РНК, в том

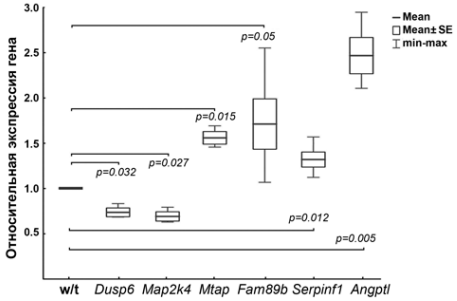


Рис. 15. Анализ уровня экспрессии генов *Dusp6*, *Fam89b*, *Map2k4*, *Mtap*, *Serpinf1* и *Angptl4* в опухоли мышей с LLC после лечения РНКазой А. В качестве референсных генов использовали *Hprt1* и *Ywhaz*. Данные представлены как mean ± SE. Уровень соответствующего гена в контроле (мыши с LLC, получавшие инъекции физ/раствора) был принят за 1.

числе и миРНК. На уровне опухолевой клетки и в кровотоке животных-опухоленосителей РНКаза А вызывает перераспределение репертуара миРНК. Такое изменение профиля миРНК в крови закономерно приводит к изменению спектра миРНК опухоли, и, как следствие, к индукции изменений в экспрессии генов в опухолевой клетке. В результате в опухоли происходит повышение функционирования энергетических каскадов, перераспределение в эффективности функционирования событий опухолевой прогрессии, связанных с регулированием клеточного роста и диссеминации, а также ослаблением функционирования сигнальных путей, участвующих в злокачественной трансформации. Эти события в совокупности приводят к подавлению опухолевой прогрессии, выражающемуся на уровне организма в ингибировании роста первичной опухоли и метастазов.

Рис. 16. Механизм противоопухолевой активности РНКазы А.

Также нельзя исключить возможного прямого действия РНКазыА на опухолевые клетки несмотря на множество литературных данных, указывающих на ее нейтрализацию в клетке за счет связывания с рибонуклеазным ингибитором (RI). Известно, что некоторые белки, принадлежащие семейству РНКазы А, способны выступать в роли транскрипционных факторов, например, ангиогенин, который на 33% идентичен РНКазе А по последовательности и на 65% гомологичен по структуре. Можно предположить, что после проникновения в клетку РНКаза А или ее ангиогенин-подобный фрагмент, образовавшийся в результате протеолиза *in vivo*, способны действовать в качестве транскрипционного фактора.

15. Исследование механизма антиметастатического действия ДНКазы I: поиск молекулярных мишеней среди внеклеточных опухоль-ассоциированных ДНК

Повышенный уровень внДНК в крови является характерной особенностью пациентов с онкологическими заболеваниями и часто ассоциируется с тяжелой опухолевой прогрессией и плохим прогнозом. Было установлено, что в состав циркулирующей внДНК входят последовательности, кодирующие онкогены, включая гиперметилированные гены-супрессоры опухолей, аберрантные микросателлиты, аберрантные метилированные гены и перегруппированные участки хромосом. В настоящее время существует несколько гипотез, указывающих на возможную роль внДНК в канцерогенезе, в связи с чем внДНК стали объектом исследования в качестве возможных опухолевых маркеров, а также мишеней противоопухолевой терапии.

Поскольку было сделано предположение, что возможными мишенями ДНКазы I могут быть внДНК, мы проанализировали концентрацию внДНК и эффективные константы скорости расщепления ДНК в плазме крови в группе здоровых мышей, в группе мышей с LLC, получавших физ/раствор, и в группе мышей с LLC, получавших ДНКазу I (0.12 мг/кг). Концентрация внДНК в плазме крови здоровых мышей C57Bl/6J составила 104 нг/мл при ДНКазной активности $(2.71\pm0.15)\times10^{-4}$ сек$^{-1}$. При прогрессии LLC было отмечено увеличение концентрации внДНК в 1.3 раза по сравнению со здоровыми животными и значительное падение ДНКазной активности до $(0.42\pm0.03)\times10^{-4}$ сек$^{-1}$ (в 6.5 раз). Введение мышам C57Bl/6J с LLC ДНКазы I приводило к снижению уровня внДНК в плазме до уровня здоровых животных, при этом происходило повышение ДНКазной активности плазмы крови до $(3.92\pm1.40)\times10^{-4}$ (в 9.3 раза по сравнению с контролем).

С целью поиска молекулярных мишеней ДНКазы I среди внДНК был проанализировали профиль внДНК крови мышей с LLC после введения ДНКазы I с помощью массового параллельного секвенирования. Схема эксперимента представлена на Рис. 17.

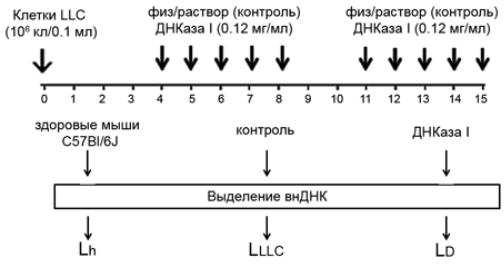


Рис. 17. Схема эксперимента для получения библиотек внДНК. Клетки LLC трансплантировали в/м мышам C57Bl/6J. Начиная с 4 дня после трансплантации опухоли, животные получали в/м физ/раствор (контроль) или ДНКазу I (0.12 мг/кг) в течение двух недель. внДНК выделяли из сыворотки и использовали для конструирования ДНК-библиотек. Библиотеки секвенировали на платформе SOLiD 5.5.

В результате были получены следующие библиотеки: L_{h1} и L_{h2} – внДНК сыворотки крови здоровых мышей; L_{LLC} – внДНК сыворотки крови животных с LLC, получавших физ/раствор; L_D – внДНК сыворотки крови мышей с LLC, получавших ДНКазу I. Секвенирование библиотек проводили на платформе

ABS SOLiD™ 5.5. Поскольку любая внДНК в кровотоке могла являться мишенью для ДНКазы I, во время анализа обращали пристальное внимание на перераспределение между фрагментами внДНК в библиотеках L_h, L_D и L_{LLC}.

GC-обедненные фрагменты. Анализ данных FastQC выявил, что внДНК из библиотеки L_{LLC} (из сыворотки крови мышей с LLC, получавших инъекции физ/раствора) характеризовались содержанием 3×10^6 GC-обедненных последовательностей (0-2% общего содержания). ДНКаза I (библиотека L_D, мыши с LLC, получавшие инъекции ДНКазы I) приводила к снижению содержания GC-обедненных последовательностей до 1.0×10^6, что было близко по величине к содержанию последовательностей в библиотеке внДНК здоровых животных ($0.5–1.0 \times 10^6$, L_h).

Тандемные повторы. Тандемные повторы представляют собой фрагменты мобильных генетических элементов, в том числе и ретротранспозонов, которые обнаруживаются в большом количестве в геноме опухолевых клеток, поэтому при поиске молекулярных мишеней ДНКазы I среди внДНК особое внимание было обращено именно на тандемные повторы. Наиболее значительные различия между библиотеками L_{LLC}, L_D и L_h наблюдались для тандемных повторов: внДНК сыворотки крови мышей с LLC характеризовалась присутствием большого количества тандемных повторов по сравнению с внДНК здоровых животных. Для анализа было выбрано 250 типов тандемных повторов с представленностью не менее одной последовательности на 1 млн последовательностей библиотеки, характеризующихся сильными различиями между группами. Было обнаружено, что при развитии LLC внДНК характеризовались высокой представленностью 204 типов тандемных повторов по сравнению со здоровыми животными (L_{LLC} vs L_{h1}, L_{h2}, Таблица 9). Представленность 158 типов тандемных повторов в L_{LLC} была в 1.5 - 2 раза выше, а представленность 46 типов повторов была в 2.5-3 раза выше, чем в L_{h1} и L_{h2} (Таблица 9). ДНКаза I вызывала снижение представленности тандемных повторов, перепредставленных в крови мышей-опухоленосителей, получавших инъекции физ/раствора: было отмечено 1.5-кратное снижение представленности тандемных повторов в L_D по сравнению с L_{LLC}. Представленность 46 типов тандемных повторов в L_{LLC} была в 1.5-2 раза ниже, чем в L_{h1} и L_{h2} ($L_{LLC} < L_h$, Таблица 9). Применение ДНКазы I в результате приводило к снижению представленности 39 типов повторов на 10-30% и повышению представленности семи типов повторов на 20-50% (Таблица 9).

Содержание внДНК сыворотки крови мышей с LLC характеризовалось повышенной представленностью тандемных повторов, принадлежащих к 15 главным подсемействам, по сравнению со здоровыми животными. Следует отметить, что после применения ДНКазы I представленность повторов, принадлежащих к подсемействам ERVB, L1 и RLTR, достигала значений, характерных для здоровых животных. Другие тенденции наблюдались в случае повторов, принадлежащих к подсемействам Lx, MMERV и RMER. Представленность 14, 5 и 22 типов повторов, принадлежащих к подсемействам Lx, MMERV и RMER, соответственно, возросла в 1.5-2 раза при развитии LLC

по сравнению со здоровыми животными, а после применения ДНКазы I наблюдалось снижение представленности этих повторов на 30-50% по сравнению с содержанием повторов для здоровых животных.

Таблица 9. Представленность 250 типов тандемных повторов в ДНК-библиотеках.

	Типы тандемных повторов, количество	**Представленность, RPM[1]**			
		L_{LLC}	L_D	L_{h1}	L_{h2}
$L_{LLC} > L_h$: 204	158	53193	43612	34469	36318
	46	10221	8341	3635	3859
$L_{LLC} < L_h$: 46	39	17827	15726	28777	30996
	7	431	504	1502	1489
Всего	250	81674	68186	38104	40176

[1]RPM – количество фрагмент-специфичных прочтений на млн прочтений в библиотеке.

Отдельно было рассмотрено 19 типов повторов, принадлежащих к подсемействам B1, B2, B3 и B4, которые имеют высокую гомологию с ALU-повторами человека. При развитии LLC представленность таких повторов среди внДНК крови двукратно возрастала по сравнению со здоровыми животными (7.5×10^3 RPM в L_{LLC} против 3.4×10^3 RPM в L_{h1} и L_{h2}). ДНКаза I вызывала снижение представленности таких повторов на 20% (6.1×10^3 RPM в L_D). При этом для повторов подсемейства B1 было показано увеличение представленности в 2.5 раза при развитии опухоли (4.9×10^3 RPM в L_{LLC} против 1.9×10^3 RPM в L_{h1} и L_{h2}) и снижение до уровня здоровых животных после введения ДНКазы I (2.0×10^3 RPM в L_D).

Фрагменты ДНК, кодирующие опухолеспецифические гены. С целью поиска возможных молекулярных мишеней ДНКазы I среди опухолеспецифических генов был проведен анализ генов *Hmga2, Fos, Myc, Nras* и *Jun*, которые обнаруживаются в крови при некоторых типах злокачественных новообразований. Среди внДНК здоровых мышей представленность таких фрагментов была низка. При развитии LLC представленность фрагментов, кодирующих опухолеспецифические гены, возрастала в 10 раз по сравнению со здоровыми животными, при этом 90% от всех фрагментов приходилось на долю гена *Myc*. Представленность фрагментов генов *Hmga2, Fos* и *Jun* возрастала в 2 - 3 раза по сравнению со здоровыми животными, в то время как представленность фрагмента гена *Nras* не изменялась. ДНКаза I снижала представленность фрагментов *Myc* и Jun в 1.5-2 раза, а представленность фрагмента *Hmga2* – практически до уровня здоровых животных.

С целью выявления влияния ДНКазы I на уровень ретротранспозонных фрагментов в крови животных-опухоленосителей было проведено определение уровня SINE и LINE элементов в крови мышей C57Bl/6J с LLC и с меланомой B16, получавших и не получавших ДНКазу I, с помощью qПЦР. Как видно из представленных данных, уровень и B1- и L1-повторов крайне низок в сыворотке крови здоровых животных, что согласуется с данными секвенирования.

Прогрессия LLC приводила к 5-кратному возрастанию B1-повторов и 4-кратному возрастанию L1-повторов (Рис. 18, А, Б). В случае меланомы также происходило увеличение представленности этих типов повторов: B1- и L1-повторы возрастали в 2.6 раза (Рис. 18, В, Г). При применении ДНКазы I наблюдалось снижение уровня тандемных повторов обоих типов до уровня здоровых животных.

Таким образом, впервые было показано, что антиметастатическое действие ДНКазы I ассоциировано с деградацией специфических внДНК в кровотоке животных-опухоленосителей, и основными ее мишенями являются фрагменты опухоль- ассоциированных генов *Hmga2*, *Myc* и *Jun* и тандемных повторов подсемейств B1-B4 и L1, уровень которых повышен в кровотоке животных-опухоленосителей. Наиболее важным результатом является то, что в кровотоке мышей- опухоленосителей ДНКаза I снижает уровень тандемных повторов B-подсемейства, имеющих высокую степень гомологии с ALU повторами

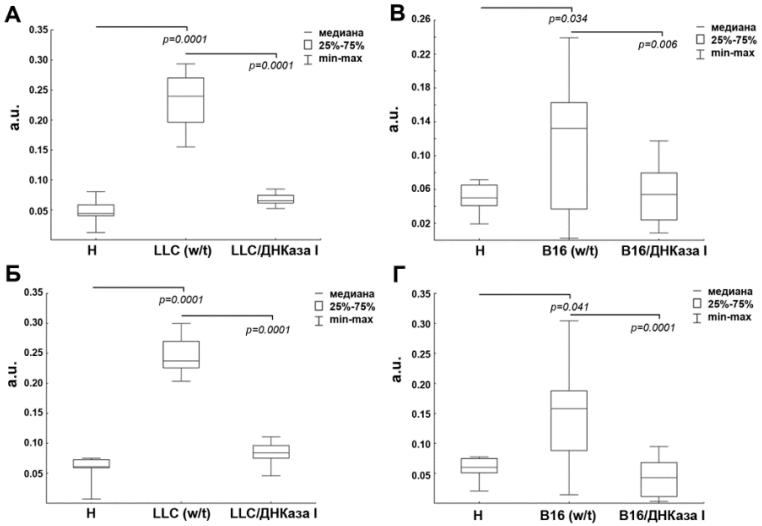


Рис. 18. Анализ уровня SINE (подсемейство B1) и LINE (подсемейство L1) элементов в сыворотке крови здоровых мышей, мышей с LLC и мышей с меланомой B16, получавших ДНКазу I, методом qПЦР. **А, В.** Уровень SINE элементов. a.u.=[SINE элементы]/[внДНК]. **Б, Г.** Уровень LINE элементов. a.u.=[LINE элементы]/[внДНК]. H – здоровые мыши C57Bl/6J; LLC(wt) – мыши с LLC; LLC/ДНКаза I - мыши с LLC, получавшие ДНКазу I (0.12 мг/кг), B16(wt) – мыши с меланомой B16; B16/ДНКаза I - мыши с меланомой B16, получавшие ДНКазу I (0.12 мг/кг). Данные статистически анализировали с помощью однофакторного дисперсионного анализа с апостериорным критерием Фишера.

человека, которые являются маркерами канцерогенеза, до уровня здоровых животных. Полученные данные позволяют предположить, что циркулирующие внДНК играют значительную роль в диссеминации опухоли, а изменение уровня

множества молекулярных мишеней в кровотоке под действием ДНКазы I снижает инвазивный потенциал опухолей.

Заключение

Таким образом, исследованные неадресные и адресные липосомы обладают трансфекционной активностью, сравнимой с лучшими системами доставки, и могут быть использованы для доставки опухолеспецифических РНК в ДК *in vivo* и индукции созревания высокоиммуногенных ДК. Показана возможность использования таких комплексов адресных липосом в качестве бесклеточных противоопухолевых вакцин, сравнимых по эффективности с ДК-вакцинами, нагруженными *ex vivo* комплексами такого же состава. Показано, что профилактическая схема применения ДК-вакцин наиболее эффективна в отношении высокоагрессивных метастазирующих опухолей, тогда как терапевтическая схема - неметастазирующих опухолей. ДК-вакцины характеризуются *in vivo* отсутствием активации провоспалительного ответа и поляризацией как Th1, так и Th2 типов Т-хелперного ответа со сдвигом равновесия Th1 > Th2.

Впервые продемонстрирован противоопухолевый и антиметастатический потенциал бычьей панкреатической РНКазы А и РНКазы *Bacillus intermedius* (биназы) и антиметастатический потенциал бычьей панкреатической ДНКазы I на широком спектре опухолевых моделей. Выявлены перспективы дальнейшего исследования этих ферментов в качестве противоопухолевых препаратов в пре-клинических и клинических исследованиях.

Показано, что применение РНКазы А и биназы для лечения животных с модельными опухолями сопровождалось положительной модуляцией противоопухолевого иммунного ответа, которая заключалось в снижении уровня провоспалительных цитокинов и повышении уровня интерферонов. Впервые показано, что ДНКаза I вызывает неспецифическую антигенную стимуляцию при введении в организм животных-опухоленосителей. Мы предполагаем, что иммуностимулирующее действие ДНКазы I может вносить вклад в наблюдаемый антиметастатический эффект за счет повышения функционирования компонентов иммунной системы, находящихся в состоянии супрессии при прогрессировании опухоли, в частности.

Впервые показано, что противоопухолевое и антиметастатическое действие РНКазы А реализуется посредством многоуровневой регуляции, как на уровне опухолевой клетки, так и на уровне организма. На уровне опухолевой клетки и в кровотоке животных-опухоленосителей РНКаза А вызывает перераспределение репертуара миРНК. В результате в опухоли происходит повышение функционирования энергетических каскадов, перераспределение в эффективности функционирования событий опухолевой прогрессии, связанных с регулированием клеточного роста и диссеминации, а также ослаблением функционирования сигнальных путей, участвующих в злокачественной трансформации. Эти события в совокупности приводят к подавлению опухолевой прогрессии, выражающемуся на уровне организма в ингибировании

роста первичной опухоли и метастазов.

Впервые показано, что антиметастатическое действие ДНКазы I ассоциировано с деградацией специфических внДНК в кровотоке животных-опухоленосителей, и основными ее мишенями являются фрагменты опухоль-ассоциированных генов *Hmga2*, *Myc* и *Jun* и тандемных повторов подсемейств B1 и L1, уровень которых повышен в кровотоке животных-опухоленосителей. Наиболее важным результатом является то, что в кровотоке мышей-опухоленосителей ДНКаза I снижает уровень тандемных повторов B-подсемейства, имеющих высокую степень гомологии с ALU повторами человека, которые являются маркерами канцерогенеза, до уровня здоровых животных. Таким образом, полученные данные позволяют предположить, что циркулирующие внДНК играют значительную роль в диссеминации опухоли, а изменение уровня множества молекулярных мишеней в кровотоке под действием ДНКазы I снижает инвазивный потенциал опухолей.

ВЫВОДЫ

Данная работа представляет собой фундаментальное исследование, проведенное на широком спектре моделей опухолей различного гистогенеза мыши. В результате выяснены механизмы подавления опухолевой прогрессии под действием природных нуклеаз и дендритных клеток. Выявлен ряд значимых миРНК, мРНК, тандемных повторов и онкогенов мыши, ортологи которых у человека могут быть использованы в качестве молекулярных маркеров для диагностики опухолевых заболеваний, ответа на лечение и мишеней для ген-направленной терапии.

1. Разработаны прототипы высокоэффективных дендритно-клеточных вакцин против опухолей различного гистогенеза мыши, основанные на принципе избирательной и высокоэффективной доставки опухолеспецифической РНК в составе мультикомпонентных адресных липосом, состоящих из липида на основе двух остатков холестерина, липида-хелпера и липоконъюгата, содержащего остаток маннозы, присоединенный к диалкилглицерину с помощью скваратного линкера. Показана возможность использования комплексов липосом с опухолевой РНК в качестве бесклеточных противоопухолевых вакцин, сравнимых по эффективности с ДК-вакцинами.

2. Впервые продемонстрирован противоопухолевый и антиметастатический потенциал панкреатической РНКазы А человека и микробной рибонуклеазы *Bacillus intermedius* (биназы) и антиметастататический потенциал бычьей панкреатической ДНКазы I на широком спектре опухолевых моделей. Показано, что каталитическая активность ферментов является важным условием для проявления ими противоопухолевого и антиметастатического эффекта.

3. Изучено иммуномодулирующее действие ДК-вакцин и природных нуклеаз, ассоциированное с противоопухолевым ответом. Показано, что ДК-вакцины *in vivo* индуцируют поляризацию Т-хелперных ответов как 1 так и 2 типов при сдвиге равновесия Th1 > Th2, не вызывают развития провоспалительного ответа

и индукции регуляторных Т-клеток. РНКаза А и биназа вызывают положительную модуляцию противоопухолевого иммунного ответа.

4. Исследован механизм противоопухолевого действия РНКазы А и ДНКазы I:

- Показано, что молекулярными мишенями РНКазы А являются миРНК в кровотоке и клетках опухоли. Под действием РНКазы А в крови происходит снижение уровня миРНК, а в опухолевых клетках – индукция их синтеза наряду с повышением уровня экспрессии генов, участвующих в биогенезе миРНК, и снижением уровня экспрессии ингибиторов биогенеза миРНК. Важным результатом является повышение уровня миРНК семейства let-7, негативно регулирующих развитие опухоли.

- РНКаза А вызывает изменение транскриптома опухолевой клетки, свидетельствующее о повышении энергетического метаболизма, изменении функционирования каскадов, регулирующих клеточный рост и метастазирование, а также значительном подавлении активности сигнальных путей TGF-β, JAK/STAT и MAPK, участвующих в злокачественной трансформации клетки, за счет негативной регуляции.

- Показано, что антиметастатическое действие ДНКазы I сопровождается снижением представленности в крови животных-опухоленосителей фрагментов онкогенов Hmga2, Myc и Jun и 224 типов тандемных повторов, включая повторы L1 и B1-B4 подсемейств, уровень которых напрямую коррелирует с уровнем метастазирования.

Основные результаты диссертации изложены в следующих работах

Обзоры

1. Патутина О.А., Миронова Н.Л., Власов В.В., Зенкова М.А. Новейшие подходы к лечению онкологических заболеваний: противоопухолевые препараты на основе ген-направленных нуклеиновых кислот. // Acta Naturae. – 2009. – V. 1. –№ 2. – P. 47–66.

2. Марков О.В., Миронова Н.Л., Власов В.В., Зенкова М.А. Молекулярные и клеточные механизмы формирования дендритными клетками противоопухолевого иммунного ответа // Acta Naturae. – 2016. – Т. 8. – № 3. – С. 19–33.

3. Марков О.В., Миронова Н.Л., Власов В.В., Зенкова М.А. Противоопухолевые вакцины на основе дендритных клеток: от экспериментов на животных моделях до клинических испытаний // Acta Naturae. – 2017. – Т. 9. – № 3. – С. 29–41.

Статьи в научных журналах

1. Mironova N., Shklyaeva O., Andreeva E., Popova N., Kaledin V., Nikolin V, Vlassov V., Zenkova M. Animal model of drug resistant tumor progression // Ann. N Y Acad. Sci. – 2006. – V. 1091. – P. 490–500.

2. Андреева Е.М., Миронова Н.Л., Шкляева О.А., Попова Н.А., Зенкова М.А. Участие генов mdr1a, mdr1b, p53 и bcl-2 в формировании устойчивости клеток лимфосаркомы RLS мышей к терапевтическому действию циклофосфана //

Вестник НГУ, раздел: клеточная биология, клиническая медицина. – 2006. – Т. 4. – С. 21–26.
3. Шкляева О.А., Миронова Н.Л., Малкова Е.М., Таранов Е.И., Рябчикова Е.И., Зенкова М.А., Власов В.В. Онкосупрессивное действие РНКазы А и ДНКазы I // Докл. Акад. наук. – 2008. – Т. 420. – № 1. С. 134–138.
4. Миронова Н.Л., Панжинский Е.Э., Попова Н.А., Николин В.П., Зенкова М.А., Власов В.В. Специфически активированные дендритные клетки – клеточные вакцины против лимфосаркомы с фенотипом множественной лекарственной устойчивости // Докл. Акад. наук. – 2009. – Т. 428. – № 4. – С. 550–555.
5. Patutina O., Mironova N., Popova N., Kaledin V., Nikolin V., Vlassov V., Zenkova M. The siRNA targeted to mdr1b and mdr1a mRNAs in vivo sensitizes murine lymphosarcoma to chemotherapy // BMC Cancer. – 2010. – V. 10. – P. 204.
6. Патутина О.А., Миронова Н.Л., Рябчикова Е.И., Попова Н.А., Николин В.П., Каледин В.И., Власов В.В., Зенкова М.А. Противоопухолевое и антиметастатическое действие РНКазы А и ДНКазы I // Acta Naturae. – 2010. – Т. 2. – № 1. – С. 95–100.
7. Патутина О.А., Миронова Н.Л., Логашенко Е.Б., Попова Н.А., Николин В.П., Васильев Г.В., Каледин В.И., Зенкова М.А., Власов В.В. Метаболит циклофосфамида, запускающий апоптоз в клетках лимфосаркомы мыши RLS, является субстратом для р-гликопротеина // Бюллетень эксп. биол. мед. – 2011. – Т. 152. – № 9. – С. 318–322.
8. Patutina O.A., Mironova N.L., Ryabchikova E.I., Popova N.A., Nikolin V.P., Kaledin V.I., Vlassov V.V., Zenkova M.A. Inhibition of metastasis development by daily administration of ultralow doses of RNase A and DNase I // Biochimie. – 2011. – V. 93. – P. 689–696.
9. Sen'kova A.V., Mironova N.L., Patutina O.A., Ageeva T.A., Zenkova M.A. The toxic effects of polychemotherapy onto the liver are accelerated by the upregulated MDR of lymphosarcoma // ISRN Oncology. – 2012. – V. 2012. – Article ID 721612.
10. Markov O.V., Mironova N.L., Maslov M.A., Petukhov I.A., Morozova N.G., Vlassov V.V., Zenkova M.A. Novel cationic liposomes provided highly efficient delivery of DNA and RNA into dendritic cell progenitors and their immature offsets // J. Control Release. – 2012. – V. 160. – № 2. – P. 200–210.
11. Mironova N.L., Petrushanko I.Y., Patutina O.A., Sen'kova A.V., Simonenko O.V., Mitkevich V.A., Markov O.V., Zenkova M.A., Makarov A.A. Ribonuclease binase inhibits primary tumor growth and metastases via apoptosis induction in tumor cells // Cell Cycle. – 2013. – V. 12. – № 13. P. 2120–2131.
12. Mironova N., Patutina O., Brenner E., Kurilshikov A., Vlassov V., Zenkova M. MicroRNA drop in the bloodstream and microRNA boost in the tumour caused by treatment with ribonuclease A leads to an attenuation of tumour malignancy // PLoS One. – 2013. – V. 8. – e83482.
13. Sen'kova A.V., Mironova N.L., Patutina O.A., Mitkevich V.A., Markov O.V., Petrushanko I.Y., Burnysheva K.M., Zenkova M.A., Makarov A.A. Ribonuclease binase decreases destructive changes of the liver and restores its regeneration potential in mouse lung carcinoma model // Biochimie. – 2014. – V. 101. – P. 256–259.

14. Markov O.V., Mironova N.L., Shmendel E.V., Serikov R.N., Morozova N.G., Maslov M.A., Vlassov V.V., Zenkova M.A. Multicomponent mannose-containing liposomes efficiently deliver RNA in murine immature dendritic cells and provide productive anti-tumour response in murine melanoma model // J. Control Release. – 2015. – V. 213. – P. 45–56.
15. Markov O.V., Mironova N.L., Sennikov S.V., Vlassov V.V., Zenkova M.A. Prophylactic dendritic cell-based vaccines efficiently inhibit metastases in murine metastatic melanoma // PLoS One. – 2015. – V. 10. – e0136911.
16. Марков О.В., Миронова Н.Л., Шмендель Е.В., Маслов М.А., Зенкова М.А. Эффективная активация цитотоксических Т-лимфоцитов, направленных к клеткам меланомы мыши, под действием дендритных клеток // Молекулярная биология. – 2017. – Т. 51. – № 1. – С. 118–125.
17. Алексеева Л.А., Патутина О.А., Сенькова А.В., Зенкова М.А., Миронова Н.Л. Подавление инвазивных свойств меланомы мыши под действием бычьей панкреатической ДНКазы I in vitro и in vivo // Молекулярная биология. – 2017. – Т. 51. – № 4. – С. 637–646.
18. Alekseeva L.A., Mironova N.L., Brenner E.V., Kurilshikov A.M., Patutina O.A., Zenkova M.A. The antimetastatic action of bovine pancreatic DNase I is mediated via alteration of the exDNA level in blood serum of LLC-bearing mice // PLoS One. – 2017. – V. 12. – e0171988.
19. Mironova N.L., Patutina O.A., Brenner E.V., Kurilshikov A.M., Vlassov V.V., Zenkova M.A. The systemic tumor response to RNase A treatment affects the expression of genes involved in maintaining cell malignancy // Oncotarget. – 2017. – V. 8. – № 45. – P. 78796–78810.

Патенты

1. Шкляева О.А., Миронова Н.Л., Зенкова М.А., Власов В.В. Способ лечения злокачественных опухолей у животных. Патент на изобретение №2317825, 27 февраля 2008

Работа выполнена при поддержке грантами РФФИ 17-04-00999 и КОМФИ 17-00-00059.